



**UNIVERSIDAD  
ANDRÉS BELLO**

**Universidad Andrés Bello**  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**Evaluación del efecto de Imiquimod sobre TAPCells y líneas de melanoma humanas como posible agente adyuvante en terapia contra el cáncer**

Tesis presentada como parte de los requisitos para  
optar al Grado de **Magíster en Biotecnología**.

**Directora de Tesis:** Dra. Mercedes López  
**Facultad:** Facultad de Medicina  
**Universidad:** Universidad de Chile

**Iván Esteban Flores Colmann**

**Santiago, Chile.**

**Abril, 2016**



**UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO**

Facultad de Ciencias Biológicas

Ingeniería en Biotecnología

**" Evaluación del efecto de Imiquimod sobre TAPCells y líneas de melanoma humanas como posible agente adyuvante en terapia contra el cáncer"**

**Iván Esteban Flores Colmann**

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión de la Directora de Tesis Dra. Mercedes López, en el laboratorio de Regulación e Inmunología del Cáncer, Universidad de Chile, aprobado por los miembros de la Comisión de evaluación.

---

Dra. Mercedes López  
Directora de Tesis

---

Dr. Mario Rosemblatt  
Comisión de Tesis

---

Dr. Jaime Villegas  
Comisión de Tesis

SANTIAGO-CHILE  
Año 2016

A mis padres y hermano, por inculcarme  
el gusto por la curiosidad, a Daniela por estar  
conmigo difíciles y finalmente a Antonella por  
ser la luz en mis noches oscuras.

.

## **Agradecimientos.**

A aquellos amigos de la universidad que hicieron que esos años fuesen más simples a través de risas, juntas de estudios y apoyo en los momentos difíciles. A la Dra. Claudia Riedel y al Dr. Kalergis, recalcando la paciencia y amor de la Dra. Riedel al enseñarme los primeros pasos de la carrera científica. A la Dra. Mercedes López, por aceptarme en el Laboratorio de Inmunología y Regulación del Cáncer de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile a finales del 2011 como alumno de unidad de investigación. Sin esa oportunidad, no me hubiese enamorado de la inmunología tal como lo estoy hoy en día. También quiero agradecer a la Dra. López por creer en mí y aceptarme como alumno de doctorado. En mi estadía en este laboratorio quiero mostrar mi gratitud a Fabián por su buena disposición a enseñar la inmunología de mesón, a Cristián Falcón por las buenas pláticas, reforzarme la tenacidad y perseverancia en los experimentos, a Jimena por estar ahí alegrando los días y finalmente a Felipe Falcón por apoyarme en el desarrollo de esta tesis tanto aportando ideas, ayuda experimental como dando soporte emocional. También quiero agradecer al Laboratorio de Inmunología Tumoral liderado por el Dr. Flavio Salazar, en especial a él por demostrar lo importante que es criticar la ciencia y por estar ahí cuando necesité cartas de recomendaciones, a Cristián Pereda por ser el arregla problemas de ese laboratorio y por las tardes de Poker, a Israel por enseñarme a realizar los ensayos citotóxicos, charlas varias y por mostrarme el “Askeroso”, a Ignacio por las charlas inmunológicas e intercambio de video juegos, a las nuevas generaciones Fernando y Mariela. A la Dra. Osorio, Bernardita y a Cristobal Toty Costoya (disculpa por House of M), finalmente al apoyo administrativo de Marisol.

A la comisión de Magister, por darse el tiempo de evaluar este trabajo y aportar comentarios e ideas para el proyecto. Al Dr. Villegas por enseñarme por primera vez lo que es realmente Biología Celular en el 2007. Al Dr. Roseblatt por guiarme en el Doctorado, compartir su amor por la inmunología, mostrarme su visión de vida y por enseñarme que hay decisiones que se tienen que tomar con el “estomago”.

No puedo dejar de mencionar a toda mi familia con especial énfasis a mi Madre y Padre, por estar apoyándome desde que conocí el mundo y estar ahí en todas mis decisiones.

Finalmente quiero agradecer al Instituto Milenio de Inmunología y a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica por financiar este trabajo.

## Indice

<b>1. Abreviaturas</b>	8
<b>2. Resumen</b>	14
2.1. Abstract	15
<b>3. Introducción</b>	16
3.1. El melanoma maligno	16
3.2. Inmunoterapia contra melanoma	17
3.3. Células dendríticas y su uso en inmunoterapia	18
3.4. La experiencia de nuestro laboratorio en inmunoterapia contra melanoma maligno	21
3.5. Receptores de tipo Toll en inmunoterapia	22
3.6. Utilización de Imiquimod en cáncer	24
3.7. Hipótesis	27
3.8. Objetivo General	27
3.9. Objetivos específicos	27
<b>4. Materiales y Métodos</b>	28
4.1. Generación de DCs funcionalmente y fenotípicamente diferentes	28
4.2. Cell Sorting LT CD3	29
4.3. Co-cultivos DCs-LT CD3	29
4.4. Estimulación de Líneas de Melanoma con Imiquimod	30
4.5. Ensayo de citotoxicidad mediada por células NK	30
4.6. Ensayo de citotoxicidad mediada por células CD8 Mart-1 específicas	31
4.7. Citometría de flujo	31
4.8. Análisis Estadístico	32
<b>5. Resultados</b>	33

5.1.Imiquimod induce la expresión de marcadores de maduración y una disminución en marcadores inhibitorios en DCs. ....	33
5.2.TAPCells tratadas con Imiquimod aumentan la inducción de linfocitos CD4 <sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ .....	38
5.3. Evaluación de moléculas de histocompatibilidad tanto clásicas como no clásicas en líneas de melanoma tratadas con Imiquimod. ....	41
5.4. Imiquimod aumenta la expresión de moléculas tanto co-estimuladoras como del complejo principal de histocompatibilidad de clase II en líneas de melanoma. ....	46
5.5. Imiquimod aumenta la citotoxicidad mediada por células NK y linfocitos CD8 <sup>+</sup> Mart-1 específicos, en líneas celulares de melanoma.....	48
<b>6. Discusión.</b> .....	52
<b>7. Conclusiones y proyecciones</b> .....	58
<b>8. Bibliografía</b> .....	59

## 1. Abreviaturas

**AcMo:** Anticuerpo monoclonal.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**APC:** Células presentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells*) / alofococianina (Allophycocyanin).

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**CCR1:** Receptor de quimioquina tipo 1 (con motivo C-C). (CD191).

**CCR5:** Receptor de quimioquina tipo 5 (con motivo C-C). (CD195).

**CCR7:** Receptor de quimioquina tipo 7 (con motivo C-C). (CD197, BLR2).

**CD1d:** Proteína tipo MHC no clásica. Presentación de antígenos lipídicos.

**CD3:** Molécula accesoria del TCR.

**CD4:** Correceptor de señalización y adhesión de linfocitos T restringido a MHC-II.

**CD8:** Correceptor de señalización y adhesión de linfocitos T restringido a MHC-I.

**CD11c:** Integrina  $\alpha_x$ . (Subunidad 4 del receptor del componente 3 del complemento).

**CD28:** Receptor de CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2).



**CD40:** Integrina de membrana, molécula de activación de linfocitos T.

**CD40L:** Ligando del receptor CD40, integrina  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha IIb\beta 3$ . (TRAP, CD154, TBAM, TNFSF5).

**CD48:** Marcador de activación 1 de células B. Ligando de CD2. (17D6, BCM1, BLAST, B-LAST 1).

**CD56:** Molécula de adhesión neural.

**CD58:** Antígeno 3 asociado a la función de linfocitos. Ligando de CD2. (LFA-3).

**CD68:** Ligando de lipoproteínas de baja densidad.

**CD80:** Molécula co-estimuladora B7.1, ligando de CD28.

**CD83:** Molécula de activación en células dendríticas.

**CD86** Molécula co-estimuladora B7.2, ligando de CD28.

**CD94:** Receptor inhibitorio de NK. (KLRD1).

**CpG:** Regiones del ADN altamente ricas en citosina y guanina.

**CTLA-4:** Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*).  
Receptor de CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). (CD152)

**CTL:** Linfocitos T Citotóxicos (*Cytotoxic T Lymphocytes*).

**DAMPs:** Patrones moleculares asociadas al daño (*Damage Associated Patterns*).

**DC:** Célula Dendrítica (*Dendritic Cells*).

**DTH:** Respuesta de hipersensibilidad retardada o tipo IV (*Delayed Type IV Hypersensitivity*).

**FasL:** Ligando del receptor de apoptosis FAS. (CD95L).

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*).

**GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor*).

**HMGB1:** Proteína de alta movilidad del grupo 1 (*High-Mobility Group Box 1 protein*).

**iDC:** Célula Dendrítica Inmadura.

**IFN- $\alpha$ :** Interferon-alpha, interferón de tipo I.

**IFN- $\gamma$ :** Interferon-gamma, interferón de tipo II.

**IL:** Interleuquina.

**IL-17R:** Receptor de interleuquina 17.

**IMF:** Intensidad de fluorescencia media.

**IMQ DCs:** Protocolo de generación de DCs en presencia sólo de Imiquimod.

**IS:** Sinápsis Inmunológica.

**KIRs:** Receptores inhibitorios de muerte (*Killer-cell Immunoglobulin Receptors*).

**LPS:** Lipopolisacárido.

**LT:** Linfocitos T.

**MHC-I:** Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I (*Major Histocompatibility Complex*).

**MHC-II:** Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase II (*Major Histocompatibility Complex*).

**MICA/B:** Cadenas A/B relacionadas al complejo principal de Histocompatibilidad.  
Ligando de NKG2D.

**NCRs:** Receptores Citotóxicos Naturales (*Natural Cytotoxic Receptors*).

**NF-κB:** factor nuclear κB.

**NK:** Células Asesinas naturales (*Natural Killer cells*).

**NKG2D:** Receptor de células asesinas del grupo 2 miembro D (*Natural-Killer Group 2, member D*).Receptor de los ligandos MIC.

**NKT:** Células T Asesinas Naturales (*Natural Killer T Cells*).

**PAMPs:** Patrones moleculares asociados a patógenos (***P**atogen **A**ssociated **M**olecular **P**atterns*).

**PBL:** Linfocitos de sangre periférica (***P**eripheral **B**lood **L**ymphocytes*).

**PBMC:** Células mononucleares de sangre periférica (***P**eripheral **B**lood **M**ononuclear cell*).

**PBS:** Fosfato buffer salino (***P**hosphate **B**uffer **S**aline*).

**PD-1:** Proteína de muerte celular programada 1 (***P**rogrammed cell **D**eath protein 1*).  
Receptor de PD-L1.

**PD-L1:** Ligando de muerte programada 1 (***P**rogrammed death-ligand 1*) Ligando de PD-1.

**PE:** Ficoeritrina.

**PFA:** paraformaldehído.

**PMA:** Acetato Miristato de forbol (***P**horbol **M**yristate **A**cetate*).

**PRR:** Receptor de reconocimiento de patrones (***P**attern **R**ecognition **R**eceptor*).

**rhGM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante humana.

**rhIL:** Interleuquina recombinante humana.

**TAPCells:** Células Presentadoras de Antígenos Tumorales (***T**umor **A**ntigen **P**resenting **C**ells*).

**TAPCells IMQ:** Protocolo de generación de TAPCells en presencia de Imiquimod.

**Tol DCs:** Célula presentadora de antígenos tolerogénica basada en TRIMEL.

**T-bet:** factor de transcripción T-bet.

**TCR:** Receptor linfocito T (*T Cell Receptor*).

**TGF- $\beta$ 1:** Factor de transformación y crecimiento beta 1 (*Transforming Growth Factor Beta 1*).

**T<sub>H</sub>:** Linfocitos T *helper* (*T Helper lymphocytes*).

**T<sub>H</sub> 1:** Linfocitos T helper tipo 1 (*T Helper lymphocytes type 1*).

**T<sub>H</sub> 2:** Linfocitos T helper tipo 2 (*T Helper lymphocytes type 2*).

**T<sub>H</sub>3:** Linfocitos T helper 3 (*T Helper lymphocytes type 3*).

**T<sub>H</sub>17:** Linfocitos T helper tipo 17 (*T Helper lymphocytes 17*).

**TLR:** Receptor tipo Toll (*Toll Like Receptor*).

**TNF:** Factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*).

**TRIMEL:** Lisado de Líneas de Melanoma.

## 2. Resumen.

El melanoma es un cáncer cuya incidencia y mortalidad han aumentado significativamente en las últimas dos décadas. Hoy en día, terapias basadas en la manipulación del sistema inmune ha demostrado resultados alentadores en esta patología, como por ejemplo, el uso vacunas de células dendríticas (DCs).

En nuestro laboratorio hemos inmunizado a más de 300 pacientes con melanoma avanzado utilizando DCs cargadas con lisados de melanoma alogénicos, denominadas TAPCells. Hemos observado dos grupos de pacientes, uno que genera respuestas de hipersensibilidad retardada (DTH) contra antígenos tumorales, lo que indica el desarrollo de memoria inmunológica *in vivo*, denominados *respondedores* (DTH+) y otro que no genera memoria y que denominamos *no respondedores* (DTH-). Clínicamente, aquellos respondedores mostraron una sobrevida tres veces superior al grupo no respondedor.

En la actualidad, se ha demostrado que el uso de agonistas de TLR-7 como adyuvantes en vacunas antitumorales favorecen la generación de respuestas de tipo  $T_H1$  en modelos tumorales murinos. En este proyecto evaluamos la utilización de Imiquimod, un agonista TLR-7 como adyuvante en la maduración de TAPCells. Esto conllevó un aumento en la expresión de la molécula co-estimuladora CD86, con disminución de PD-L1, generando así una disminución de la relación PDL1/CD86 lo que se traduce en una mayor capacidad de activación por las DCs sobre los linfocitos. Es más, las TAPCells tratadas con Imiquimod fueron capaces de aumentar la población  $CD4^+$  productora de  $IFN-\gamma$ . Adicionalmente, Imiquimod tuvo un efecto directo sobre líneas de melanoma humano, no sólo en generar un aumento de MHC-I y MICA/B, sino también de incrementar, la citotoxicidad mediada por linfocitos T  $CD8^+$  Mart-1 específicos y células NK. De esta forma, presentamos los primeros estudios para modificar la terapia TAPCells al ocupar un agonista TLR7. Además, demostramos un nuevo rol de Imiquimod sobre células tumorales de melanoma que podría indicar una alternativa para el manejo de tumores localizados.

## 2.1. Abstract.

Malignant Melanoma incidence and mortality have increased through the last decades. Nowadays, therapies that modulate the immune system have proven to be successful to treat this pathology, such as dendritic cells (DCs) based immunotherapies.

In our laboratory we have immunized more than 300 patients with advanced melanoma using DCs loaded with allogeneic melanoma lysates, called TAPCells. We observed two groups of patients, one that generates delayed hypersensitivity responses (DTH) against tumor antigens, indicating the development of immunological memory *in vivo*, called *responders* (DTH +) and one that does not generate memory and call *non responders* (DTH -). Clinically, those responders showed a survival rate three times higher than non-responder group.

At present, it has been shown that the use of TLR-7 agonists as adjuvants in tumor vaccines substantially favor the generation of T<sub>H</sub>1-type responses in murine tumor models. This project evaluated the use of Imiquimod a TLR-7 agonist as an adjuvant in the maturation of TAPCells. This entailed an increase in the expression of the costimulatory molecule CD86, with decreased PD- L1, thus generating a lower ratio PD- L1 / CD86 resulting in increased activation ability DCs on lymphocytes. Moreover, TAPCells treated with Imiquimod were able to increase the population of CD4 + IFN-  $\gamma$  production.

Additionally, Imiquimod had a direct effect on human melanoma lines, not only in generating an increase in MHC- I, MICA/B among, other molecules examined, but also to increase the cytotoxicity mediated by specific CD8<sup>+</sup> Mart-1 lymphocytes and NK cells. Thus, we present the first preclinical modifications to the TAPCells therapy. Furthermore, we demonstrate a new role of Imiquimod on melanoma tumor cells that might indicate an alternative for the management of localized tumors.

### **3. Introducción.**

#### **3.1. El melanoma maligno.**

Los tumores malignos son la segunda causa de muerte en nuestro país, llegando a un 24,6% de las defunciones, solamente precedido por las enfermedades cardiovasculares, aunque se estima que para el 2025, las patologías neoplásicas malignas pasarán a ser la primera causa de muerte ([www.minsal.cl](http://www.minsal.cl))

El melanoma maligno es un cáncer de origen neuroectodérmico que afecta a los melanocitos y a células pigmentarias del iris y la úvea. Es una enfermedad que posee una gran agresividad, que metastatiza rápidamente, siendo el factor de riesgo más importante para desarrollar la enfermedad el antecedente de quemadura solar, especialmente en la niñez (Revisado por James M. Grichnik, 2007).

A nivel mundial el melanoma posee tasas de incidencia ajustada por edad de 18,1 por cada 100.000 habitantes en países desarrollados y de 1,3 por cada 100.000 habitantes en países menos desarrollados y tasas de mortalidad ajustadas por edad de 2,19 por 100.000 habitantes y de 0,3 por cada 100.000 habitantes respectivamente (Rigel *et al.*, 2010), convirtiéndose así en el cáncer de piel que produce más muertes en Chile y el mundo ([www.minsal.cl](http://www.minsal.cl)). En nuestro país, entre los años 2000 y 2010 se constataron 1.657 muertes por melanoma, y su incidencia aumentó de 1,1 en 1990 a 1,9 casos por 100.000 habitantes en el año 2007 ([www.minsal.cl](http://www.minsal.cl)). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, el número de casos de melanoma a nivel global se han incrementado con mayor rapidez que otros tipos de cánceres en los últimos años, afectando a más de 2,4 millones de personas en todo el mundo, con 160 mil nuevos casos y 48 mil muertes por año (Lens y Dawes, 2004).



### 3.2. Inmunoterapia contra melanoma.

Los tratamientos convencionales contra melanoma, como lo son el uso de cirugía, radioterapia y quimioterapia han dado resultados limitados. Durante las últimas dos décadas, importantes inmunoterapias han sido probadas como tratamientos alternativos contra ésta enfermedad (Kleбенoff, *et al.*, 2011). El uso de citoquinas recombinantes como IL-2 e IFN- $\alpha$ , terapias adoptivas de linfocitos T (LT), anticuerpos monoclonales y vacunas basadas en células dendríticas (DCs) junto con otras estrategias han podido proveer mejoras en el control del crecimiento tumoral y sobrevida del paciente (Kleбенoff, *et al.*, 2011).

En el 2011 la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó Ipilimumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra CTLA-4, para el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado. CTLA-4 es una molécula normalmente encontrada en compartimientos intracelulares, que transloca a la sinapsis inmunológica donde inhibe la activación de LT al unirse con gran avidez a las moléculas B7 (CD80 y CD86) deteniendo las señales de activación mediadas por CD28 en los linfocitos (Farolfi *et al.*, 2012). Además, un anticuerpo monoclonal dirigido contra una molécula co-inhibitoria expresada en linfocitos T activados (PD-1) ha mostrado resultados prometedores en diversos ensayos clínicos (Brahmer *et al.*, 2010). La inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales ha mostrado ser efectiva hasta en un 30% de los pacientes tratados. Sin embargo, este tipo de tratamiento es frecuentemente de duración limitada. Conocemos poco acerca de los mecanismos que subyacen a las respuestas clínicas diferenciales de estos pacientes, lo que dificulta el poder aumentar la eficacia de estas terapias (Kirkwood., *et al.*, 2012). Una estrategia adicional para el tratamiento del melanoma maligno es el uso de vacunas basadas en DCs. Esta tecnología ha mostrado ser segura y, lo más importante, capaz de otorgar protección inmunológica de largo plazo (Palucka *et al.*, 2012).

### 3.3. Células dendríticas y su uso en inmunoterapia.

Las células dendríticas (DCs) poseen un rol fundamental en las respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas (Iwasaki y Medzhitov, 2015). Estas células poseen alta plasticidad funcional y fenotípica ya que pueden llegar a ser muy inmunogénicas bajo condiciones inflamatorias, sin embargo, son claves en la inducción y mantención de la tolerancia periférica (Hawiger *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Bonifaz L, 2002).

En humanos, las DCs se originan a partir de precursores localizados de la médula ósea (Katz *et al.*, 1979; Steinman, 2012) y residen en tejidos periféricos, ubicándose en sitios susceptibles a la entrada de antígenos, con el fin de capturarlos, procesarlos y presentarlos asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las DCs en la periferia, en condiciones de estado estacionario, ayudan a la mantención de la tolerancia periférica, ya que están continuamente migrando a través de los tejidos y órganos linfoides capturando antígenos propios en contexto no inflamatorio (Bonasio *et al.*, 2006).

Las DCs inmaduras (iDC) se pueden caracterizar fenotípicamente por una alta expresión de CD68 y de una variedad de receptores de quimioquinas como CCR1, CCR5 y CCR6 que las mantiene localizadas en la periferia. También se caracterizan por tener una gran capacidad fagocítica y poseer una alta expresión de receptores capaces de reconocer señales de peligro (PRRs) generadas por infecciones (PAMPs) y/o daño tisular (DAMPs) permitiendo el reconocimiento de patógenos y otras moléculas necesarias para desencadenar su proceso de su maduración (Janeway y Medzhitov, 2002; Kono y Rock, 2008).

Durante el proceso de maduración, la morfología y el fenotipo de las DCs cambian, las prolongaciones citoplasmáticas aumentan y los marcadores característicos de las iDCs disminuyen. A su vez, se produce un aumento en la expresión del marcador de maduración CD83 así como de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86, CD40, moléculas presentadoras de antígenos MHC

clase I y II, moléculas de adhesión a LT como CD48 y CD58 y el receptor de quimioquinas CCR7. Este receptor tiene la función de guiar la migración de las DCs hacia los órganos linfoides secundarios (Delamarre *et al.*, 2003; Mellman y Steinman, 2001), donde encuentran a los linfocitos T vírgenes antígeno-específicos, para que éstos se activen, proliferen, se diferencien y migren a la periferia donde van a realizar sus funciones efectoras (Jin *et al.*, 2012).

Las DCs pueden interaccionar con varios tipos celulares relevantes en la respuesta inmune antitumoral como son células natural killer (NK), linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, (CTLs) y linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores (LT helper, LT<sub>H</sub>). Así, las DCs maduras que han captado antígenos tumorales provenientes del tumor, migrarán a órganos linfoides secundarios donde allí, activarán tanto a linfocitos T CD8<sup>+</sup> los cuales, reconocen el complejo MHC-I péptido y como también a linfocitos T CD4<sup>+</sup> que reconocen el complejo péptido MHC-II (Zhu y Paul 2008; 2010). Para lograr la activación linfocitaria se requiere que las moléculas CD80 y CD86, expresadas en las DCs interaccionen con el receptor CD28 de los linfocitos T (Steinman, 2011). Finalmente las DCs secretarán citoquinas claves que direccionarán la diferenciación linfocitaria. De esta forma IL-12 permitirá la diferenciación hacia un perfil antitumoral T<sub>H</sub>1, que se caracteriza por linfocitos T CD4<sup>+</sup> que son capaces de expresar el factor de transcripción T-bet lo que permite producir y secretar IFN- $\gamma$  (Xu *et al.*, 2010). Frente a una respuesta antitumoral, el perfil T<sub>H</sub>1 es fundamental debido a su capacidad de secretar IFN- $\gamma$  la cual, es un factor clave en el rechazo de tumores sólidos y está principalmente relacionada con la función efectora y la mantención del desarrollo y persistencia de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, jugando un rol fundamental en una respuesta antitumoral (Knutson y Disis, 2005; Liu *et al.*, 2008). Se ha visto que IFN- $\gamma$  restringe la angiogénesis y estimula tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Adicionalmente IFN- $\gamma$  media la muerte celular a través de una serie de mecanismos, incluyendo la exocitosis de gránulos de perforina/granzima (Bohm *et al.*, 1998). La secreción de TGF- $\beta$  e IL6 durante la activación de los LT permitirá la generación del perfil T<sub>H</sub>17, los cuales son linfocitos T CD4<sup>+</sup> capaces de secretar preferencialmente IL-17 además de IL-21 e IL-22 (Ouyang *et al.*, 2008). Además se

ha descrito que citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  muestran amplificar el desarrollo de las células T<sub>H</sub>17 (Sutton *et al.*, 2006; Piccirillo, 2008). Por otro lado, las citoquinas secretadas por las células dendríticas como IL-12, entre otras, también favorecerán a la diferenciación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> hacia linfocitos T citotóxicos (CTLs) lo cuales también pueden secretar IFN- $\gamma$ , además de producir perforinas y granzimas, las cuales, inducirán muerte celular en las células tumorales (Tscharke *et al.*, 2015). Así, estas 3 señales: el reconocimiento del complejo MHC/antígeno por los linfocitos, la estimulación que reciben a partir de las moléculas co-estimuladoras y citoquinas provenientes desde las células dendríticas, llevarán a los linfocitos T a activarse, proliferar y finalmente diferenciarse a perfiles linfocitarios específicos. Con esto, los linfocitos T podrán salir de los órganos linfoides secundarios y migrar hacia la periferia para llegar al nicho tumoral y montar una respuesta inmune contra el tumor.

Se han desarrollado diversos ensayos clínicos en humanos ocupando células dendríticas capaces de inducir una respuesta por parte de los linfocitos T en pacientes con melanoma (Gilboa, 2007; Thomas-Kaskel *et al.*, 2007; López *et al.*, 2004; Escobar *et al.*, 2005, López *et al.*, 2009).

No obstante, los primeros ensayos que utilizaron inmunizaciones con DCs autólogas pulsadas con péptidos derivados de antígenos melanosomales en pacientes con melanomas metastásicos no lograron superar o igualar los resultados que se logran con el tratamiento quimioterapéutico (Schadendorf *et al.*, 2006). En respuesta a esto, se comenzaron a utilizar otros estímulos de maduración y entrega de antígenos, entre ellos, los lisados tumorales alogénicos, logrando de esta forma, proveer antígenos específicos contra melanoma y generar respuestas a antígenos específicos además de una respuesta clínica en pacientes vacunados (Escobar *et al.*, 2005; Palucka *et al.*, 2006; Salcedo *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2010; Radej *et al.*, 2015; Chiang *et al.*, 2015).

### **3.4. La experiencia de nuestro laboratorio en inmunoterapia contra melanoma maligno.**

Desde hace ya más de 10 años, nuestro laboratorio ha desarrollado una inmunoterapia autóloga para melanoma maligno denominada TAPCells (*Tumor Antigen Presenting Cells*), utilizando DCs generadas *ex vivo* las cuales son cargadas con lisados de melanoma alogénicos, con el fin de lograr la activación específica del sistema inmune de los pacientes, logrando en una gran mayoría de los casos generar una respuesta antitumoral efectiva (Schadendorf *et al.*, 2006; You *et al.*, 2007; López *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2014 ).

En el año 2009 nuestro laboratorio finalizó el primer ensayo clínico de fase I/II utilizando células dendríticas cargadas con lisados de melanoma alogénicos, denominadas TAPCells, con el fin de activar el sistema inmune de pacientes con melanoma avanzado (Aguilera *et al.*, 2011; López *et al.*, 2009). En este estudio que involucró a 50 pacientes, se observó ausencia de reacciones adversas y un aumento de la mediana de sobrevida de los pacientes en comparación con los datos históricos (López *et al.*, 2009).

De acuerdo a la capacidad de los pacientes de generar respuestas de hipersensibilidad retardada contra antígenos tumorales (DTH), lo que indica el desarrollo de memoria inmunológica *in vivo*, hemos podido diferenciar dos grupos de pacientes, un grupo que genera memoria inmunológica contra antígenos tumorales luego de las inoculaciones de DCs, al que hemos denominado respondedores (DTH+) y otro grupo que no genera memoria inmunológica contra antígenos tumorales y que denominamos no respondedores (DTH-). El 60,98% de los pacientes tratados son respondedores (n=25) mientras que el 39,02% son no respondedores (n=16). Clínicamente, ambos grupos difieren en que aquellos respondedores mostraron una sobrevida tres veces superior al grupo no respondedor. El grupo de respondedores mostró una mediana de sobrevida de 33 meses, comparado con el grupo de no respondedores que mostró una mediana de sobrevida de 11 meses. En este último grupo de pacientes hemos establecido un

elevado y mantenido aumento en la proporción de linfocitos T reguladores T<sub>H3</sub>, productores del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (López *et al.*, 2009). Estos prometedores resultados se han mantenido sin variaciones, al analizar más de 300 pacientes con melanoma avanzado tratados con esta terapia.

Adicionalmente hemos observado que TRIMEL otorga no sólo antígenos para la activación de una respuesta inmune antitumoral específica, sino que también alarminas o DAMPs en la maduración de las TAPCells permitiendo una respuesta antitumoral efectiva (López *et al.*, 2009; González *et al.*, 2014). En este aspecto, en el año 2011, se caracterizó que TRIMEL posee diversos DAMPs, entre ellos calreticulina y la proteína “*High Motility Group Box 1*” (HMGB1), que están involucrados en la maduración de TAPCells, en su capacidad de presentación cruzada y además, en el favorecimiento de la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T activados (Aguilera *et al.*, 2011; González *et al.*, 2014).

### **3.5. Receptores de tipo Toll en inmunoterapia.**

La inmunidad innata posee receptores, ampliamente clasificados como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales reconocen específicamente patrones moleculares microbianos conservados conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Medzhitov y Janeway, 2000). Los PRRs están predominantemente expresados en células fagocíticas, como células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, monocitos y menos representados en otras células. La unión del PAMPs al PRR, gatillará una respuesta inflamatoria, que incluye la producción de citoquinas y quimioquinas las cuales ejercerán efecto sobre las respuestas inmune tanto innata como adaptativas (Iwasaki y Medzhitov, 2015).

Los receptores de tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés) son un tipo de PRRs, los cuales pueden reconocer tanto patógenos como células alteradas. La principal clasificación de estos receptores es de acuerdo a su ubicación y sus ligandos. La ubicación de los TLRs en las células pueden estar tanto en la membrana extracelular como es el caso de los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 o bien intracelular

como lo sería para TLRs 3, 7, 8 y 9. El primer grupo de receptores detectaría componentes bacterianos, como lípidos, lipoproteínas, y proteínas. Cabe destacar en este grupo a TLR-4, el cual ha sido ampliamente estudiado y uno de sus ligando es liposacárido (LPS). El segundo grupo de TLRs que se encuentra en vesículas intracelulares como retículo endoplasmático, endosomas, lisosomas y endolisosomas, son capaces de detectar ácidos nucleídos virales y bacterianos. De estos, un TLR muy estudiado es TLR-9, que es capaz de dar señalización cuando su ligando, dinucleótidos CpG no metilados son detectados (Müller *et al.*, 2008). Otro ejemplo de TLR intracelular es el TLR-7, el cual es capaz de reconocer ARN de origen vírico. Al señalizar este receptor tipo Toll, la célula montará una respuesta antiviral debido a la activación de NF- $\kappa$ B y permitiendo así la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias (Bikker *et al.*, 2014).

Ha sido reconocido hace ya casi dos décadas que la inmunidad innata es capaz de impactar a la inmunidad adaptativa (Iwasaki y Medzhitov, 2015). El descubrimiento de la vía Toll en *Drosophila* y su asociación a la inmunidad antifúngica dio origen a los estudios necesarios que permitieron el descubrimiento de esta vía en mamíferos superiores y su participación en el reconocimiento de patógenos. Finalmente el estudio de estas vías de señalización especialmente en DCs, conllevó a que entendiéramos mejor el funcionamiento de las vacunas (Medzhitov y Janeway, 1996; Akira y Kaisho, 2001). En la actualidad, por ejemplo, se sabe que parte de la acción de la toxina Coley's en minorar la progresión de algunos tipos de cáncer es porque el ADN bacterial que posee es capaz de activar TLR-9 (Hewson *et al.*, 2005). Recientemente, numerosos artículos han demostrado la habilidad adyuvante de algún agonista TLR para inducir una respuesta inmune adaptativa del tipo T<sub>H</sub>1 (Krieg, 2006; Sabado *et al.*, 2013; Goldinger *et al.* 2014).

Debido a la capacidad de los agonistas TLR en gatillar vías inflamatorias, estos han sido utilizados en inmunoterapias. En este campo el grupo de Matzner (Matzner *et al.*, 2015) ocupó un agonista TLR-4 denominado Glucopiranosil Lid-A (GLA-SE) para controlar la aparición de metástasis en varios modelos de cáncer. Una sola dosis de GLA-SE redujo el desarrollo metastásico de adenocarcinoma mamario y carcinoma de colon tanto en ratas F344 como en ratones BALB/C cuando

es administrada después de la remoción del tumor primario. Por otro lado se ha documentado que el uso de Poly (I:C), un agonista TLR-3 que ha sido ocupado ampliamente como adyuvante en estudios pre clínicos, es capaz de montar una potente respuesta inmune cuando se ocupa como adyuvante en transferencia adoptiva de células NK (Guillerey *et al.*, 2015). Otro ejemplo es el estudio fase dos del agonista sintético SD-101 administrado en conjunto con Ipilimumab para tratar el linfoma de linfocitos B ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). SD-101 es capaz de activar la vía del TLR-9 y *Ipilimumab* es un anticuerpo monoclonal que bloquea CTLA-4 ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). El agonista sintético de TLR-8, VTX-2337, también está siendo probado en un ensayo clínico de fase uno cuando es administrado en conjunto con *Cetuximab* para tratar el cáncer escamoso de cabeza y cuello (Cohen, 2014). En este caso, el agonista TLR-8 es capaz de estimular el sistema inmune para desencadenar la lisis de células tumorales mientras que el anticuerpo monoclonal es capaz de bloquear su crecimiento. En melanoma se ha utilizado el agonista TLR-3 poly ICLC como adyuvante de una inmunoterapia basada en la vacunación con péptidos NY-ESO-1 (Tsuji, 2013) el cuál terminó su estudio clínico de fase dos este año ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

### 3.6. Utilización de Imiquimod en cáncer.

Imiquimod, ([1-(2-metilpropil)-1H-imidazol[4,5-c]quinolin-4 amina], es un ligando sintético perteneciente a la familia de las imidazoquinolinas, las cuales son capaces de gatillar la vía de señalización de TLR 7 y la activación del sistema inmune (Lore *et al.*, 2003; Hemmi *et al.*, 2002). La unión de TLR 7 a sus ligandos naturales o a las imidazoquinolinas en DCs, tanto mieloides como plasmocitoides, induce maduración y secreción de importantes mediadores inflamatorios como IL-12, en el caso de las primeras, e IFN- $\alpha$ , por las segundas, ambas citoquinas de vital importancia en respuestas antivirales y antitumorales (Ito *et al.*, 2002; Gibson *et al.*, 2002). De hecho, los ratones *Knock out* para el receptor TLR-7 (*tlr7*<sup>-/-</sup>), no muestran



alteraciones fenotípicas al nacer, su inmunidad antibacteriana permanece intacta, no obstante, su respuesta inmune anti viral es precaria (Hemmi *et al.*, 2002).

Diversos estudios de inmunización en modelos animales indican que las imidazoquinolinas pueden aumentar la magnitud y calidad de las respuestas a antígenos específicos mediados por linfocitos T (Wille-Reece *et al.*, 2005; Wille-Reece *et al.*, 2006).

Imiquimod es uno de los compuestos más caracterizados de la familia de las imidazoquinolinas y es el único actualmente aprobado para uso clínico. Ha sido demostrado que posee propiedades antitumorales y antivirales, siendo aprobado su uso tanto para el virus de papiloma humano genital como para carcinoma de células basales y keratosis actínica (Beutner *et al.*, 1998; Lebwohl M *et al.*, 2004). En modelos animales, la administración de Imiquimod en inmunoterapias que usan diversos péptidos antigénicos ha demostrado potenciar la respuesta inmune, convirtiéndolo en un candidato atractivo para su uso en inmunoterapias (Simpson *et al.*, 2005; Gnjatic *et al.*, 2006). Adams (Adams *et al.*, 2008) demostró que el uso tópico de Imiquimod induce inflamación en la zona aplicada, lo que induce infiltración de células presentadoras de antígenos y linfocitos T. Recientemente se ha evaluado en un modelo murino la posible función de Imiquimod como adyuvante al administrarse de forma intradérmica después de la remoción quirúrgica de tumores en vez de la radioterapia o quimioterapia, los cuales son los tratamientos estándares para esta condición. En esta oportunidad se vio que Imiquimod, junto con un anticuerpo anti-CD40, altera significativamente el ambiente post-quirúrgico, resultando en una fuerte actividad anti-tumoral sistémica, generando un aumento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> lo que daría cuenta de la activación de estas células, en el lugar del tratamiento (Khong *et al.*, 2014).

El efecto de este agonista en las células del sistema inmune y en las células cancerosas no está del todo claro, siendo bastante controversial en la literatura. Esto se debe principalmente a la forma de administración del adyuvante y en las células que se evalúa el efecto. Es así, como se ha visto que el uso de Imiquimod

directamente en linfocitos T CD4<sup>+</sup> produce una disminución en la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y una disminución de la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  pero no la generación de un perfil regulador (Villar-Dominguez *et al.*, 2015). También se ha relacionado el uso de Imiquimod en el modelo murino de lupus, en donde maduran DCs tanto *in vitro* como *in vivo* con este agonista, obteniendo así células dendríticas con baja expresión de moléculas co-estimuladoras y del complejo principal de histocompatibilidad de clase II. Sin embargo, no se evidenció una diferencia significativa en el número de linfocitos T reguladores *in vivo* después de la administración de Imiquimod (Gong *et al.*, 2014).

En base a los antecedentes expuestos es que planteamos la siguiente hipótesis de trabajo.

### **3.7. Hipótesis**

Imiquimod es capaz de aumentar tanto la inmunogenecidad de células dendríticas terapéuticas como de líneas celulares derivadas de melanoma.

### **3.8. Objetivo General**

Determinar el efecto de Imiquimod en la generación de células dendríticas derivadas de monocitos utilizadas en inmunoterapia antitumoral y su efecto en células de melanoma humano.

### **3.9. Objetivos específicos**

1. Determinar las características fenotípicas y funcionales de células de células dendríticas derivadas de monocitos humanos tipo TAPCells, generadas en presencia de Imiquimod y su capacidad de inducir distintas poblaciones de linfocitos helper.
2. Caracterizar el efecto de Imiquimod sobre la inmunogenecidad de líneas de melanoma.

## 4. Materiales y Métodos

**4.1. Líneas celulares:** Las líneas celulares DFB, FMS, MEL 3 y DFB fueron previamente establecidas en nuestro laboratorio a partir de metástasis de pacientes con melanoma maligno. Las líneas criopreservadas a -80, fueron descongeladas con medio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, USA.) suplementado con 10% de SFB, 1% de antibióticos (penicilina 100U/L y estreptomycin 100µg/mL). Se evaluó viabilidad mediante tinción con azul de Tripán en cámara de Neubauer. Finalmente fueron resuspendidas en medio RPMI suplementado para luego sembrarlas en botellas de cultivo celular T75 (Nunc) y cultivarlas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cada 2 días se cambió el medio de cultivo de las células a medida que estas se expandían, manteniendo una confluencia celular del 75% por campo, hasta su uso.

**4.2. Generación de DCs funcionalmente y fenotípicamente diferentes:** Sangre proveniente de donadores obtenidas del banco de sangre del Hospital Salvador, fueron separadas por gradiente con Ficoll-Hypaque (Axis-Shield, Oslo, Norway), obteniéndose células mononucleares de sangre periférica (PBMC), las que se incubaron en placas de seis pocillos (Becton Dickinson, Hershey, USA) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, a una densidad de 40 x 10<sup>6</sup> cel/ml en medio de cultivo AIM-V, por 2 horas. A continuación se retiró el sobrenadante que contiene Linfocitos de Sangre Periférica (PBL) el cual fue traspasado a una botella de cultivo de 75 cc (Becton Dickinson, Hershey, USA) y las células adherentes (monocitos) fueron incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, adicionando medio de cultivo AIM-V, enriquecido con 500U/ml de rhIL-4 (USBiological) y 800U/ml de rhGM-CSF (USBiological), durante 3 días. En el primer día se adicionó 10<sup>-6</sup> M de dexametasona a las DCs tolerogénicas (Tol DCs), las cuales se ocuparon de control negativo en los co-cultivos. Al segundo día de cultivo, las células fueron maduras, por 24 horas, con distintos estímulos para obtener las diferentes DCs a analizar. Se utilizó 100µg/ml de TRIMEL para las TAPCells y Tol DCs, 100µg/ml de TRIMEL con 10µg/ml de Imiquimod (TAPCells-IMQ) y 9 horas después de adicionar TRIMEL se agregó otra dosis de 10<sup>-6</sup> M de dexametasona a las Tol DCs. En un pocillo no se agregó ningún estímulo de

maduración, catalogando éstas células como células dendríticas inmaduras (iDCs), las que fueron utilizadas como controles. Finalmente, las DCs fueron recolectadas el día 3, para la posterior realización de las caracterizaciones fenotípicas y funcionales. Todas las muestras de sangre fueron obtenidas previa firma de consentimiento informado y ofició de custodio de éstas la Dra. Mercedes López.

**4.3. Cell Sorting linfocitos T CD3<sup>+</sup>:** Los linfocitos de sangre periférica obtenidos desde la extracción de PMBC, fueron incubados con el anticuerpo anti-CD3 conjugado a Pcy7 por 20 min a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente el enriquecimiento de la población CD3<sup>+</sup> fue llevado a cabo en el “*cell sorting*” FACS ARIA III de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

**4.4. Co-cultivos células dendríticas- linfocitos T CD3<sup>+</sup>:** Los co-cultivos alogénicos entre células dendríticas, previamente estimuladas y linfocitos T CD3<sup>+</sup> previamente purificados, se realizaron en medio AIM-V libre de suero por 3 días en placas de 48 pocillos a una relación células dendríticas: linfocitos T CD3<sup>+</sup> de 1:10 y a una concentración de  $1 \times 10^6$  células. Al tercer día de co-cultivo, las células fueron estimuladas por 4 horas con Acetato Miristato de Forbol (Phorbol Myristate Acetate, PMA) / Ionomicina y Golgi Stop para posteriormente, analizar la inducción de distintos perfiles de linfocitos T<sub>H</sub> generados por las DCs, mediante citometría de flujo.

**4.5. Estimulación de líneas de melanoma con Imiquimod:** Las diversas líneas celulares de melanoma obtenidas en el laboratorio (DFB, FMS, MEL3 y MEM L3) fueron estimuladas con 20 µg/mL de Imiquimod en 2 mL de medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 10% de SFB conteniendo 1% de antibióticos (penicilina 100 U/L, estreptomicina 100 µg/ml) por 24 hrs y 48 hrs para la titulación de la estimulación con Imiquimod y finalmente 48 hrs para el resto de los análisis, tanto citometría de flujo como para el ensayo citotóxico.

**4.6. Análisis de muerte celular por Anexina V y 7AAD:** Las líneas DFB y MEM L3 previamente estimuladas con Imiquimod fueron llevadas a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL en el medio de *Binding Buffer*, el cual contiene 0.01 M Hepes (pH 7.4), 0.14 M NaCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$  para luego incubar con Anexina V (BD Pharmigen) y 7AAD (Biolegend) durante 15 min a temperatura ambiente y oscuridad. Finalmente las células fueron analizadas en el citometro de flujo FACSVerse del laboratorio Regulación e Inmunología del Cáncer perteneciente al programa disciplinario de inmunología del Instituto de Ciencias Biomédicas y su análisis se realizó mediante el programa FlowJo7.6.1.

**4.7. Ensayo de citotoxicidad mediada por células NK:** Las células NK, estimuladas 24 hrs antes con 200 U/ml de IL-2 fueron co-cultivadas (a diferentes razones NK: célula tumoral) con  $5 \times 10^3$  células FMS o MEML3 con o sin tratamiento con Imiquimod, las cuales fueron marcadas con  $\text{Cr}^{51}$ . El co-cultivo fue durante 4 horas a  $37^\circ\text{C}$ , en placas de 96 pocillos. Los sobrenadantes fueron recolectados y se realizó la lectura utilizando el equipo contador de radiación gamma (Top Count NKT, Perkin Elmer). El porcentaje de lisis especifica fue calculado a partir de la siguiente formula: porcentaje de lisis especifica =  $100 \times (\text{liberación de muestra} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})$ .

**4.8. Ensayo de citotoxicidad mediada por linfocitos  $\text{CD8}^+$  Mart-1 específicos:** Los linfocitos  $\text{CD8}^+$  que reconocen específicamente células que expresen Mart-1, fueron co-cultivados (a diferentes razones linfocitos: célula tumoral) con  $5 \times 10^3$  células FMS o MEML3 y DFB con o sin tratamiento con Imiquimod, las cuales fueron marcadas con  $\text{Cr}^{51}$ . El co-cultivo fue durante 4 horas a  $37^\circ\text{C}$ , en placas de 96 pocillos. Los sobrenadantes fueron recolectados y se realizó la lectura utilizando el equipo contador de radiación gamma (Top Count NKT, Perkin Elmer). El porcentaje de lisis especifica fue calculado a partir de la siguiente formula: porcentaje de lisis especifica =  $100 \times (\text{liberación de muestra} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})$ .

**4.9. Citometría de flujo:** Las DCs fueron caracterizadas fenotípicamente mediante citometría de flujo. Las distintas condiciones fueron lavadas con PBS 1x e incubadas con el anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-CD11c el cual puede estar conjugado con ficoeritrina (PE) , Pacific Blue o Aloficocianina (APC) , AcMo anti-HLA A, B, C conjugado a ficoeritrina (PE), AcMo anti-HLA DR, DQ, DP conjugado a isotiocinato de fluoresceína (FITC), AcMo anti-CD80 conjugado a isotiocinato de fluoresceína (FITC) , AcMo anti-CD83 conjugado a PE Cy7, AcMo anti-CD86 conjugado a ficoeritrina (PE), AcMo anti-CD40, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein isothiocyanate, FITC) y AcMo anti-CCR7 y AcMo anti-PDL-1 conjugado con aloficocianina (Allophycocyanin, APC). Luego estas son lavadas con PBS 1x y fijadas con paraformaldehído (PFA) 2x, para su posterior lectura en el citómetro de flujo. Los linfocitos CD3<sup>+</sup> obtenidos a partir del PBL, los cuales fueron ocupados en los co-cultivos fueron estimulados con Acetato Miristato de Forbol (Phorbol Myristate Acetate, PMA) (25ng/ml) / Ionomicina (1µg/ml) y 1 µg/ml de Golgi Stop (eBioscience, USA) durante 4 horas. Posteriormente, se evaluó las poblaciones linfocitarias efectoras por citometría de flujo. Para esto, se incubó 1x10<sup>6</sup> células con Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit el que consta de Fixation Buffer, BD Perm/Wash™ Buffer y los anticuerpos anti-CD4 Percp Cy5.5, anti-IL-4 APC, anti-IFN-γ FITC, anti-IL17a PE. Como control de isotipo se utilizó IgG1 de ratón conjugado con FITC, PE, PerCPCy5.5 y con APC (eBioscience, USA). Las células muertas se descartaron con la utilización de Live/Dead AQUA (Lifes Technologies). Finalmente las células fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSVerse del laboratorio Regulación e Inmunología del Cáncer perteneciente al programa disciplinario de inmunología del Instituto de Ciencias Biomédicas y su análisis se realizó mediante el programa FlowJo 7.6.1.

**4.10. Análisis Estadístico:** Los datos fueron expresados como promedios  $\pm$  la desviación estándar. El análisis estadístico utilizado para los resultados de citometría y para los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad fue la prueba t de student (datos paramétricos). Se determinó en primer lugar la normalidad de acuerdo a la varianza de los resultados y luego la significancia estadística considerando un intervalo de confianza de 95% y error del 5%.



## 5. Resultados.

### 5.1. Imiquimod induce la expresión de la molécula co-estimuladora CD86 y una disminución de la expresión de la molécula co-inhibitoria PD-L1.

Las células dendríticas son las únicas capaces de activar a linfocitos T vírgenes *in vivo*. Para que esta activación sea óptima las células dendríticas (DCs) deben no sólo, presentar los antígenos en el contexto de MHC y secretar citoquinas, sino de manera primordial, expresar un conjunto de moléculas co-estimuladoras y co-inhibitorias, que entregan las señales que definirán el resultado neto de esta activación.

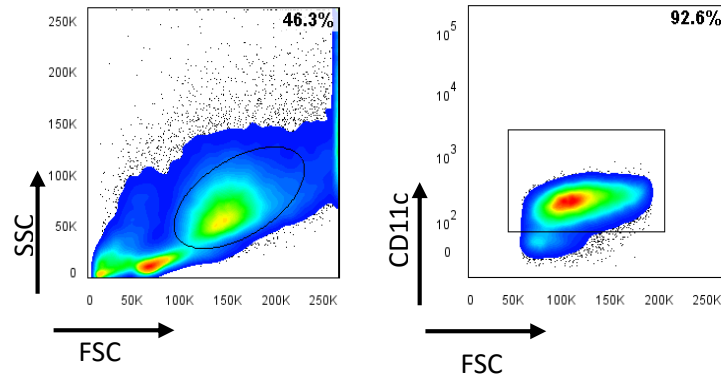
Para determinar si Imiquimod puede estimular iDCs utilizamos 4 distintas concentraciones de Imiquimod para evaluar la expresión de CD86, la cual es una molécula fundamental en la co-estimulación a linfocitos T y un marcador característico de células dendríticas maduras (Figura 1). Para esto estimulamos iDCs con 4 concentraciones de Imiquimod (2,5µg/mL; 5µg/mL; 10µg/mL y 20µg/mL). Observamos que la dosis de 10µg/mL indujo un aumento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la molécula CD86 en comparación con las iDCs, sin diferencia con el efecto observado con la dosis de 20µg/mL de Imiquimod. Sin embargo, los niveles de expresión no superaron los observados cuando utilizamos TRIMEL como estímulo de maduración.

Luego evaluamos si Imiquimod puede potenciar a TRIMEL a inducir una mayor maduración en las DCs utilizando un panel ampliado de marcadores de maduración, co-estimulación e inhibición en las células dendríticas generadas (Figura 2). No observamos diferencias en el aumento en la expresión de MHC-I, MHC-II o CD1d, de iDCs estimuladas con TRIMEL e Imiquimod con respecto a las células dendríticas estimuladas solo con TRIMEL. Notablemente, el tratamiento de iDC con la combinación de TRIMEL e Imiquimod induce una mayor expresión de CD86 con respecto a las que solo fueron estimuladas con TRIMEL (TAPCells). Adicionalmente, observamos disminución en la expresión de CD40 una molécula co-estimuladora y del ligando de muerte programada 1, PD-L1, el cual se ha

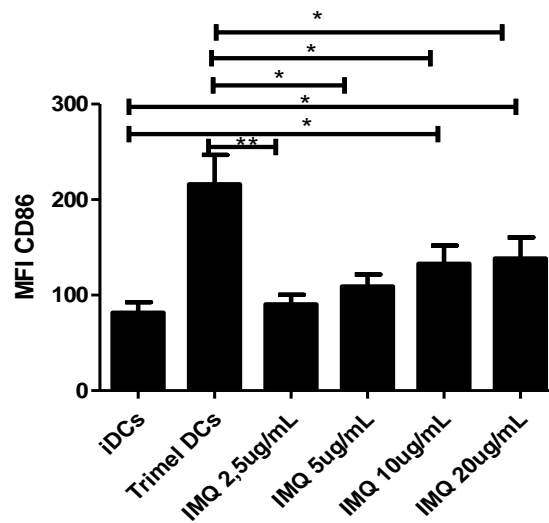
relacionado fuertemente con un rol de supresión de la respuesta inmune al unirse a su receptor PD-1 en los linfocitos (Falcón *et al.*, aceptado para publicación).

El balance entre marcadores co-inhibitorios y co-estimulatorios puedan regular la interacción de la DCs con las células T. Debido a esto evaluamos la expresión de PD-L1 versus CD86 en los diferentes protocolos de DCs. Como se ve en la Figura 3 la razón PD-L1/CD86 disminuye significativamente en TAPCells que fueron estimuladas con Imiquimod en comparación con las células dendríticas que solo fueron tratados con TRIMEL. En trabajos previos publicados por el laboratorio se ha visto que este balance podría tener un rol importante en determinar si la función de las TAPCells serán activadora o tolerogénica (Falcón *et al.*, aceptado para publicación).

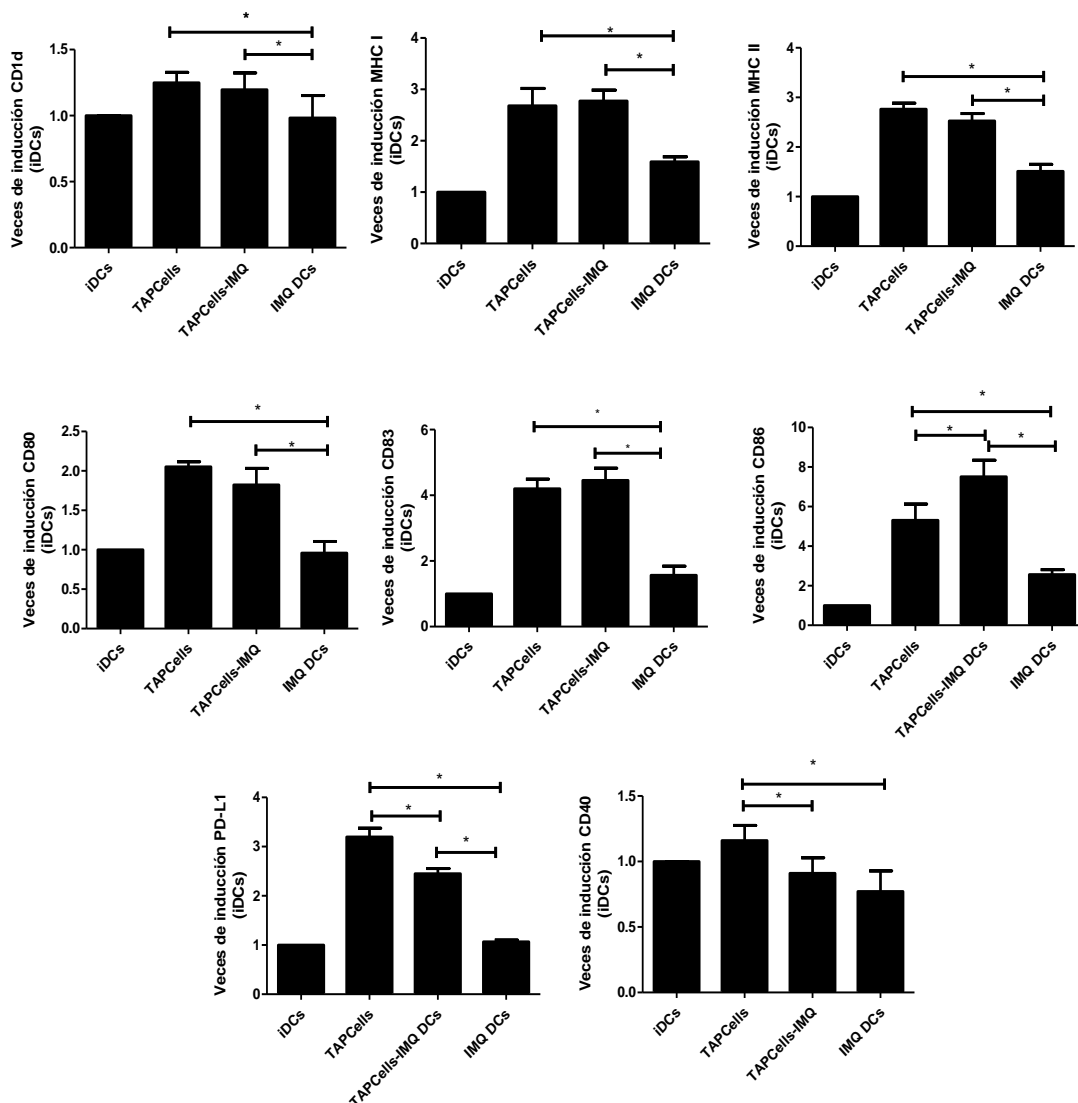
A



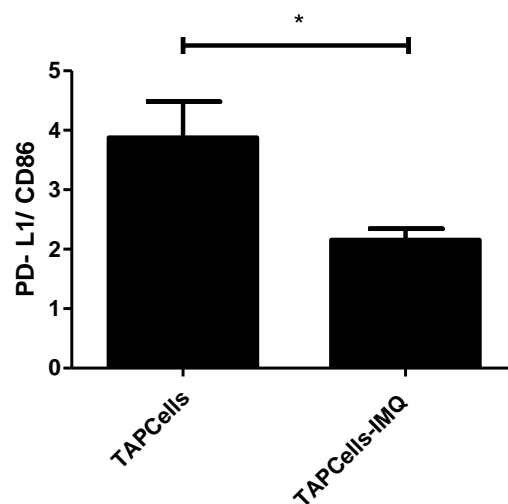
B



**Figura 1. Imiquimod induce CD86 en células dendríticas tipo TAPCells.** Células dendríticas fueron generadas como se describió previamente en la sección Materiales y Métodos. En A) De muestra la estrategia de análisis de la población CD11c<sup>+</sup> y en B) La intensidad de fluorescencia media obtenida a partir de la expresión de CD86 en las células dendríticas tratadas con distintas concentraciones de Imiquimod, determinada por citometría de flujo. Los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  SD de cuatro experimentos diferentes. El análisis estadístico fue realizado usando *T-test* no pareado. (\*p<0,05; \*\*p<0,01).



**Figura 2.** Imiquimod genera un aumento en la expresión de la molécula co-estimuladora CD86 y una disminución de PD-L1 células dendríticas tipo TAPCells. Se generaron células dendríticas de la forma ya descrita en Materiales y Métodos. Dentro de la población CD11c<sup>+</sup>, se analizó mediante citometría de flujo, la la expresión moléculas de presentación antigénica CD1d, MHC-I, MHC-II, las moléculas co-estimuladoras CD80, CD83, CD86, CD40 y finalmente la molécula co-inhibitoria PD-L1, los cuales fueron expresados como veces de inducción de intensidad de fluorescencia media relativo a iDCs (células dendríticas inmaduras). El análisis estadístico fue realizado usando T-test no pareado. (\*p<0,05).



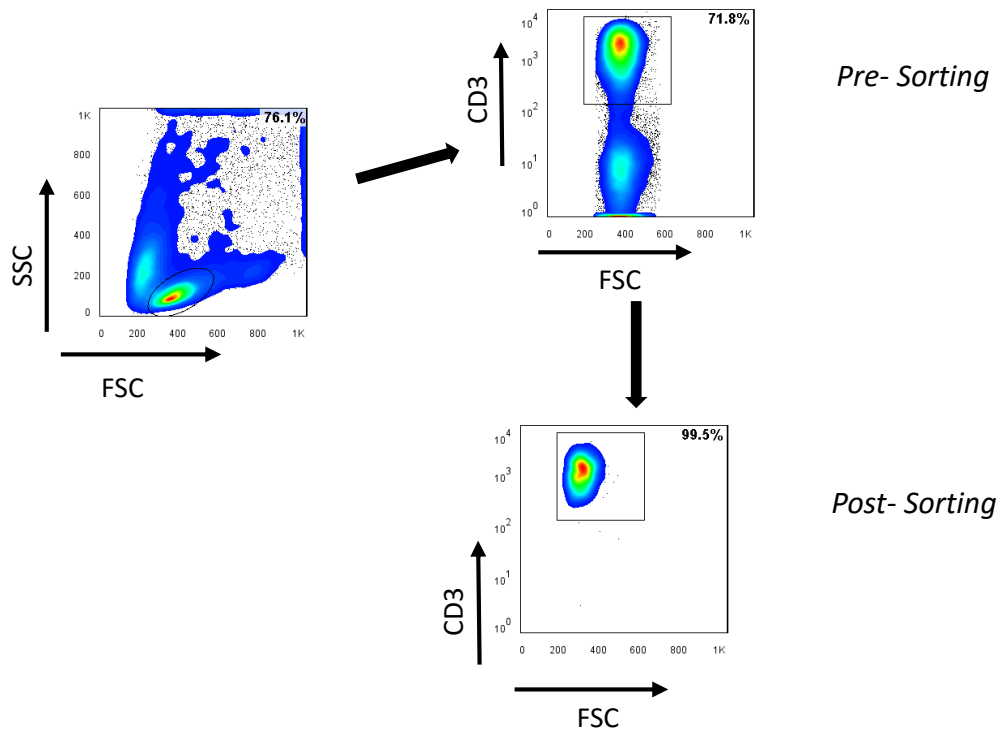
**Figura 3. El tratamiento de Imiquimod sobre TAPCells genera una disminución de la razón de moléculas inhibitorias/moléculas co-estimuladoras en células dendríticas.** Los resultados muestran la razón PD-L1 versus CD86 calculada mediante la intensidad de fluorescencia media obtenida por citometría de flujo de las distintas condiciones de DCs generadas. Los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  SD de cuatro experimentos diferentes. El análisis estadístico fue realizado usando *T-test* no pareado. (\* $p < 0,05$ ).

## 5.2. TAPCells tratadas con Imiquimod aumentan la inducción de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ .

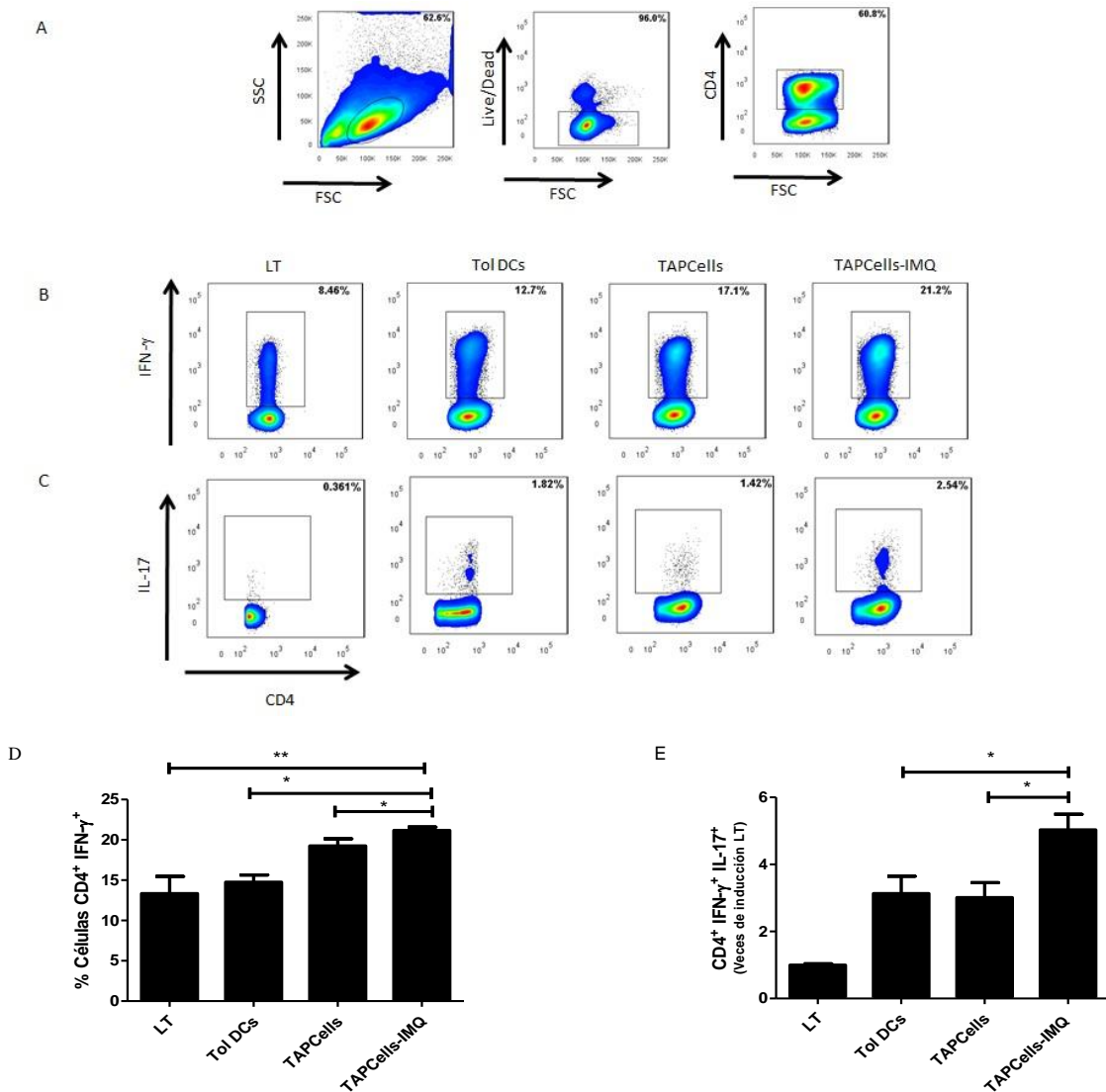
Posterior a la presentación antigénica por DCs activadas, los LT CD4<sup>+</sup> son activados específicamente y diferenciados en distintos perfiles. Para evaluar los perfiles inducidos por TAPCells tratadas con Imiquimod, éstas fueron co-cultivadas con linfocitos T CD3<sup>+</sup> alogénicos, previamente purificados desde linfocitos de sangre periférica con la tecnología “*Cell Sorting*” (Figura 4), en un co-cultivo alogénico de 3 días. Las condiciones experimentales del co-cultivo fueron linfocitos T CD3<sup>+</sup> con DCs estimuladas con TRIMEL (TAPCells), TRIMEL e Imiquimod (TAPCells-IMQ DCs) y TRIMEL y dexametasona (Tol DCs) en una razón DCs: linfocitos T CD3<sup>+</sup> 1:10 (Figura 5).

Como resultado del “*Cell Sorting*” (Figura 4) se obtuvo una purificación de la población de linfocitos CD3<sup>+</sup> sobre el 99%, los que fueron utilizados para realizar los co-cultivos. En la figura 5 se ilustra con “*dots plots*” representativos la estrategia de selección para la población CD4<sup>+</sup> que se evaluó. Tanto TAPCells como TAPCells estimuladas con Imiquimod potencian la activación del perfil T<sub>H</sub>1 (Figura 5 D), encontrándose una mayor inducción por parte de estas últimas. Por otro lado, los linfocitos co-cultivados con DCs tolerogénicas producen poblaciones T<sub>H</sub>1 similar a los linfocitos no activados. Evaluamos si las TAPCells tratadas con Imiquimod (TAPCells-IMQ) eran capaces de generar poblaciones de LT CD4<sup>+</sup> que fueran capaces de secretar IFN- $\gamma$  e IL-17 (Figura 5 E). Observamos, que la población doble positivo IFN- $\gamma$  e IL-17 es casi 2 veces más en comparación con los linfocitos co-cultivados con TAPCells y 5 veces más que los linfocitos sin estímulos.

Estos resultados indican que la presencia de distintos estímulos inducen DCs con propiedades funcionales diferentes, lo que podría influir en el desarrollo de distintos perfiles de linfocitos T, limitando o favoreciendo la respuesta inmune anti melanoma y ser un factor relevante en el resultado clínico de esta terapia.



**Figura 4. Enriquecimiento de la población CD3<sup>+</sup> a partir de PBL.** Los linfocitos de sangre periférica (PBL), fueron marcados con el anticuerpo anti-CD3, con el fin de enriquecer esta población desde PBL total con la tecnología *Cell Sorting*. En la figura se puede ver *dot plots* representativos de este proceso. En la izquierda se ve la estrategia de selección para los linfocitos. En el lado derecho se ve tanto el “*pre-sorting*” (superior) como el “*post-sorting*” del proceso (inferior).



**Figura 5. Linfocitos CD4<sup>+</sup> co-cultivados con TAPCells tratadas con Imiquimod aumentan la proporción de células productoras de IFN- $\gamma$ .** Los linfocitos CD3<sup>+</sup> alogénicos previamente enriquecidos fueron co-cultivados con DCs que han sido activadas con TRIMEL (TAPCells), TRIMEL e Imiquimod (TAPCells- IMQ) y finalmente TRIMEL y Dexa (Tol DCs) por 3 días. “Dots plots” representativos de los experimentos. En A) se representa la estrategia de selección de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. B) ilustra la producción de IFN- $\gamma$  por parte linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En C) la evaluación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IL-17. En D) se observa la cuantificación del porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ . Finalmente B) muestra las veces de inducción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> doble positivas tanto para IFN- $\gamma$  como IL-17 con respecto a la condición de LT sin estímulo. El análisis estadístico fue realizado usando *T-test* no pareado. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). N=4.



### **5.3. Evaluación de moléculas de histocompatibilidad tanto clásicas como no clásicas en líneas de melanoma tratadas con Imiquimod.**

Pese a que se ha estudiado el efecto de Imiquimod sobre tumores o líneas tumorales, aún quedan interrogantes sobre su mecanismo de acción. Se ha visto que es capaz de generar apoptosis en líneas tumorales debido a la translocación del citocromo C desde la mitocondria al citoplasma celular, lo que conllevará la activación de la vía de las caspasas y su consecuente ingreso al proceso de muerte celular programada. Aún así hay varios mecanismos de acción desconocidos de este fármaco. Nos preguntamos si Imiquimod contribuye a la erradicación del tumor aumentando su inmunogenicidad.

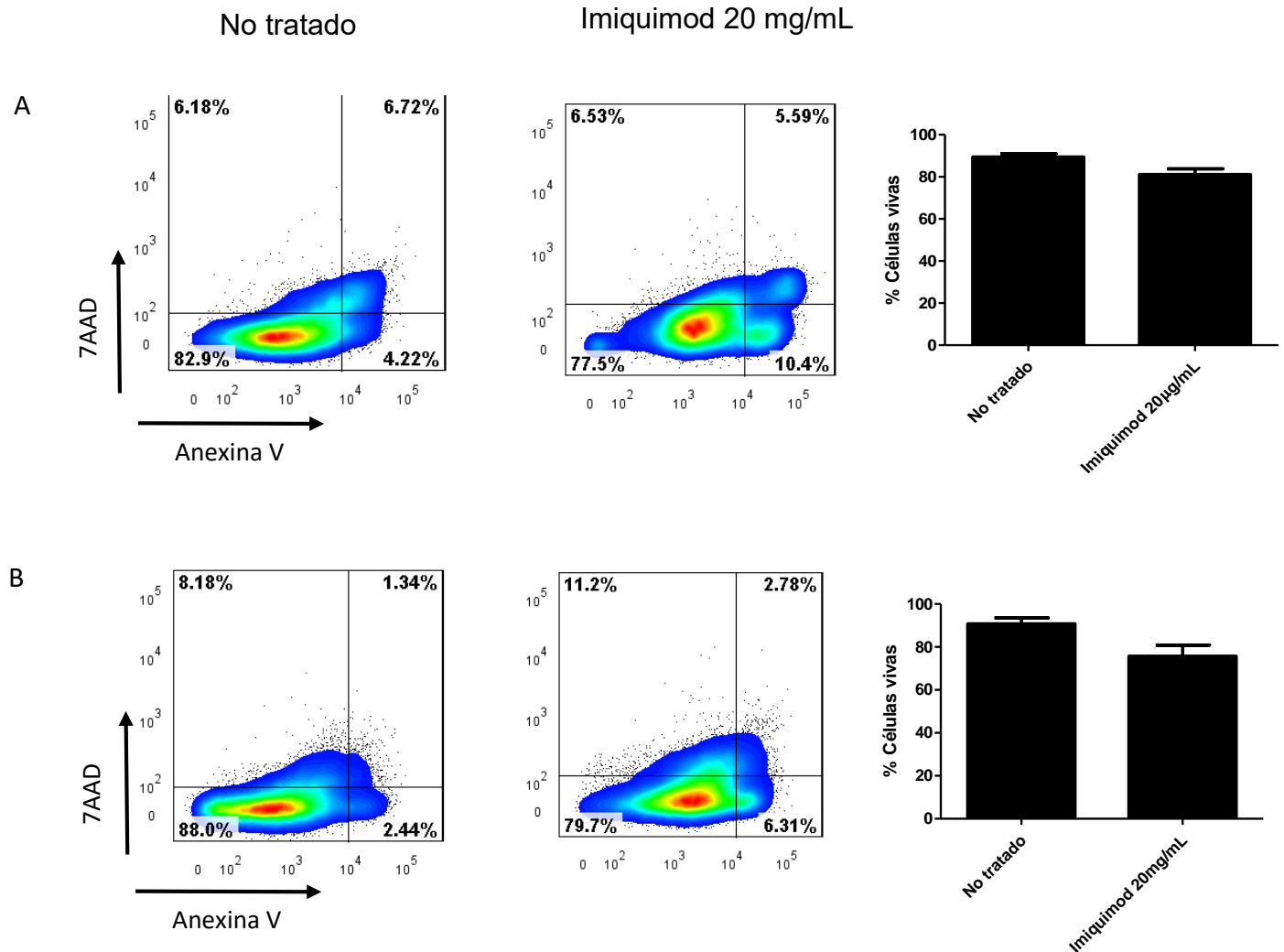
Como se mencionó anteriormente Imiquimod genera apoptosis en líneas celulares de diversos tipos de cánceres. Para evaluar la concentración máxima a la que no se induce apoptosis (Figura 6), estimulamos las líneas DFB y MEM L3 con 20µg/mL por 48 hrs y analizamos por citometría de flujo la unión de Anexina V a fosfatidilserina, un lípido que se transloca al lado extracelular de la membrana plasmática cuando la célula entra en apoptosis. No encontramos diferencias significativas en el porcentaje de células vivas al comparar las líneas DFB y MEM L3 tratadas con Imiquimod a 20µg/mL contra el control no tratado, por lo tanto consideramos que Imiquimod a 20µg/mL no induce apoptosis en líneas de melanomas cuando son tratadas por 48 horas.

Posteriormente analizamos la expresión del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, CD1d y MIC A/B, al tratar diversas líneas de melanoma con Imiquimod. En primer lugar se realizó una cinética de estimulación de las líneas celulares de melanoma FMS y MEM L3 por 24 y 48 hrs con 20µg/mL de Imiquimod. La citometría de flujo mostró un aumento significativo de la expresión en membrana de MHC-I para la línea FMS tanto a las 24 horas como a las 48 horas, siendo este el punto donde se alcanzó su máxima expresión y generó un aumento aproximado de casi dos veces en comparación con el no estimulado (Figura 7 B). En la línea MEM L3, en cambio, el aumento fue significativo pero más discreto,

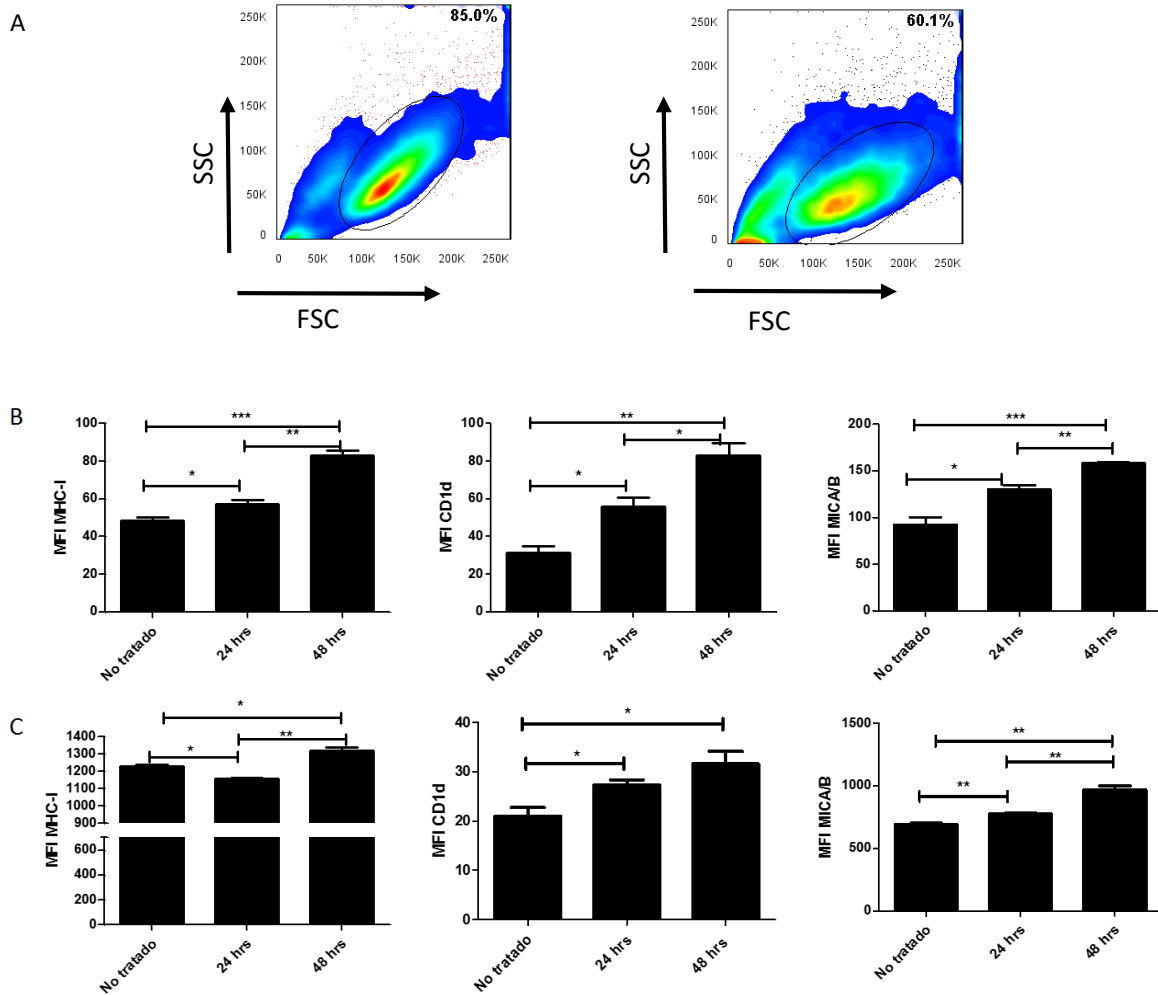
probablemente debido a los altos niveles basales ésta molécula (Figura 7 C). Con respecto a CD1d, la línea FMS (Figura 7 B) aumenta su expresión a las 24 y 48 horas de estimulación al doble y al triple respectivamente. Al ver la línea MEM L3, también se ve un aumento significativo tanto a las 24 horas como a las 48 horas de estimulación con 20µg/mL de Imiquimod logrando ver un incremento de cerca de un 50% con respecto al no estimulado al cabo de 48 horas. Finalmente al analizar MICA/B, en la línea FMS (Figura 7 B) se ve un aumento de la intensidad media de fluorescencia de la expresión de membrana de esta molécula tanto a las 24 como a las 48 horas, siendo en esta última condición donde se ve su mayor aumento, alcanzando un incremento del 40% en comparación al control no tratado. Mientras tanto, la línea MEM L3 mostró un aumento de un 25% de intensidad de fluorescencia en este marcador cuando son tratados con Imiquimod.

Posteriormente decidimos evaluar el efecto de Imiquimod en más líneas tumorales, por lo que utilizamos 48 horas de estímulo ya que en esta condición se generó un aumento mayor de la intensidad media de fluorescencia mayor que a 24 hrs.

Decidimos evaluar adicionalmente las líneas de melanoma DFB y MEL3, ambas componentes de TRIMEL, con el fin de ver si el efecto visto es reproducible en estas líneas como lo fue con las anteriores. En efecto, tanto líneas DFB y MEL3 (Figura 8 A y B) presentan un incremento significativo en la expresión de las moléculas MHC-I, CD1d y MICA/B, según lo demostrado por citometría de flujo, al tratar las líneas por 48 hrs con 20 ug/mL de Imiquimod. Es de notar también los altos niveles basales de estas moléculas en la línea DFB, antes del tratamiento con Imiquimod (Figura 8 A).

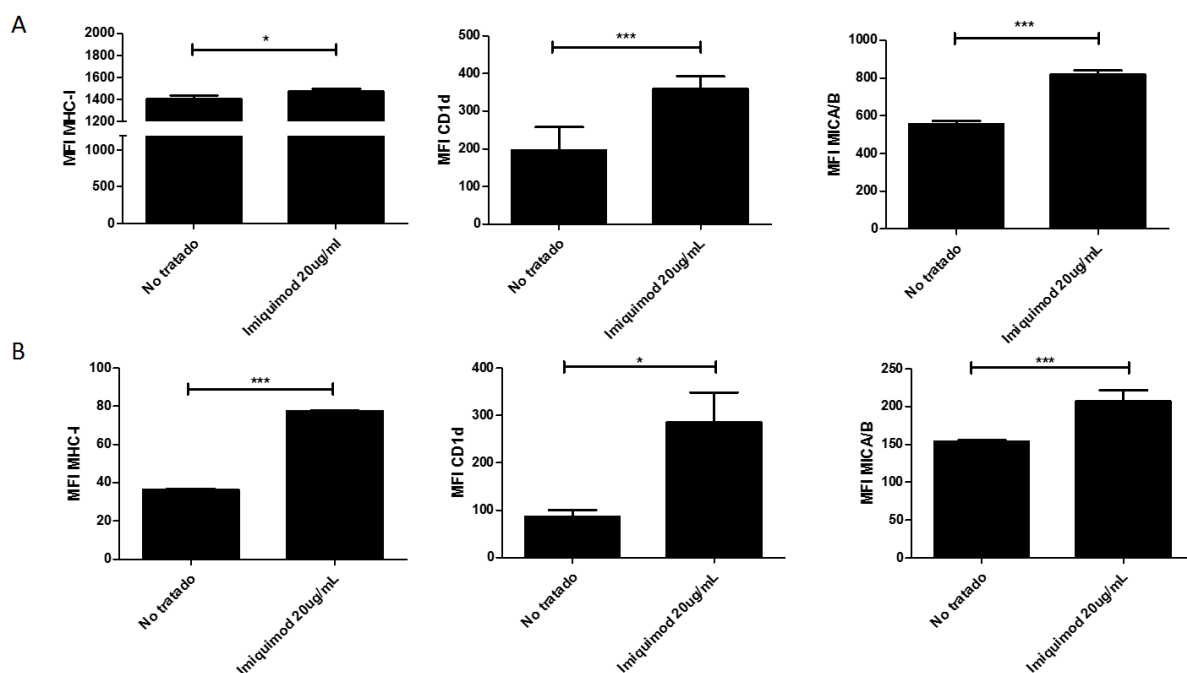


**Figura 6. El tratamiento con Imiquimod 20 µg/mL por 48 hrs no induce apoptosis en líneas celulares de melanoma.** Las líneas de melanoma DFB (A) y MEM L3 (B) fueron cultivadas con 20µg/mL de Imiquimod para luego realizar un ensayo de viabilidad. Este ensayo fue realizado con Anexina V y 7 AAD y el porcentaje de células vivas fue obtenido por citometría de flujo. Los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  SD de tres experimentos diferentes. El análisis estadístico fue realizado usando *T-test*. N= 3



**Figura 7. El tratamiento de líneas celulares de melanoma FMS y MEM L3 con Imiquimod induce un aumento en la expresión de moléculas presentadoras de antígeno tanto clásicas como no clásicas.** Las líneas FMS y MEM L3 fueron tratadas con 20µg/mL de Imiquimod por 24 y 48 hrs. En A se muestra un *dot plot* representativo de la estrategia de selección para el posterior análisis. En B y C se muestra la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia para las moléculas MHC-I, CD1d y MICA/B en la línea FMS (B) y MEM L3 (C). Los resultados son mostrados como promedio  $\pm$  SD de tres experimentos diferentes. El análisis estadístico fue realizado usando *T-test* no pareado. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

N= 3



**Figura 8. El tratamiento de líneas celulares de melanoma DFB y MEL 3 con Imiquimod induce un aumento en la expresión de moléculas presentadoras de antígeno tanto clásicas como no clásicas.** Las líneas DFB y MEL 3 fueron tratadas con 20µg/mL de Imiquimod por 48 hrs. La estrategia de selección por citometría de flujo fue la misma ocupada en la figura 9. En A y B se muestra la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia para las moléculas MHC-I, CD1d y MICA/B en la línea DFB (A) y MEL3 (B). Los resultados son mostrados como promedio  $\pm$  SD de tres experimentos diferentes. El análisis estadístico fue realizado usando *T-test* no pareado. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). N= 3

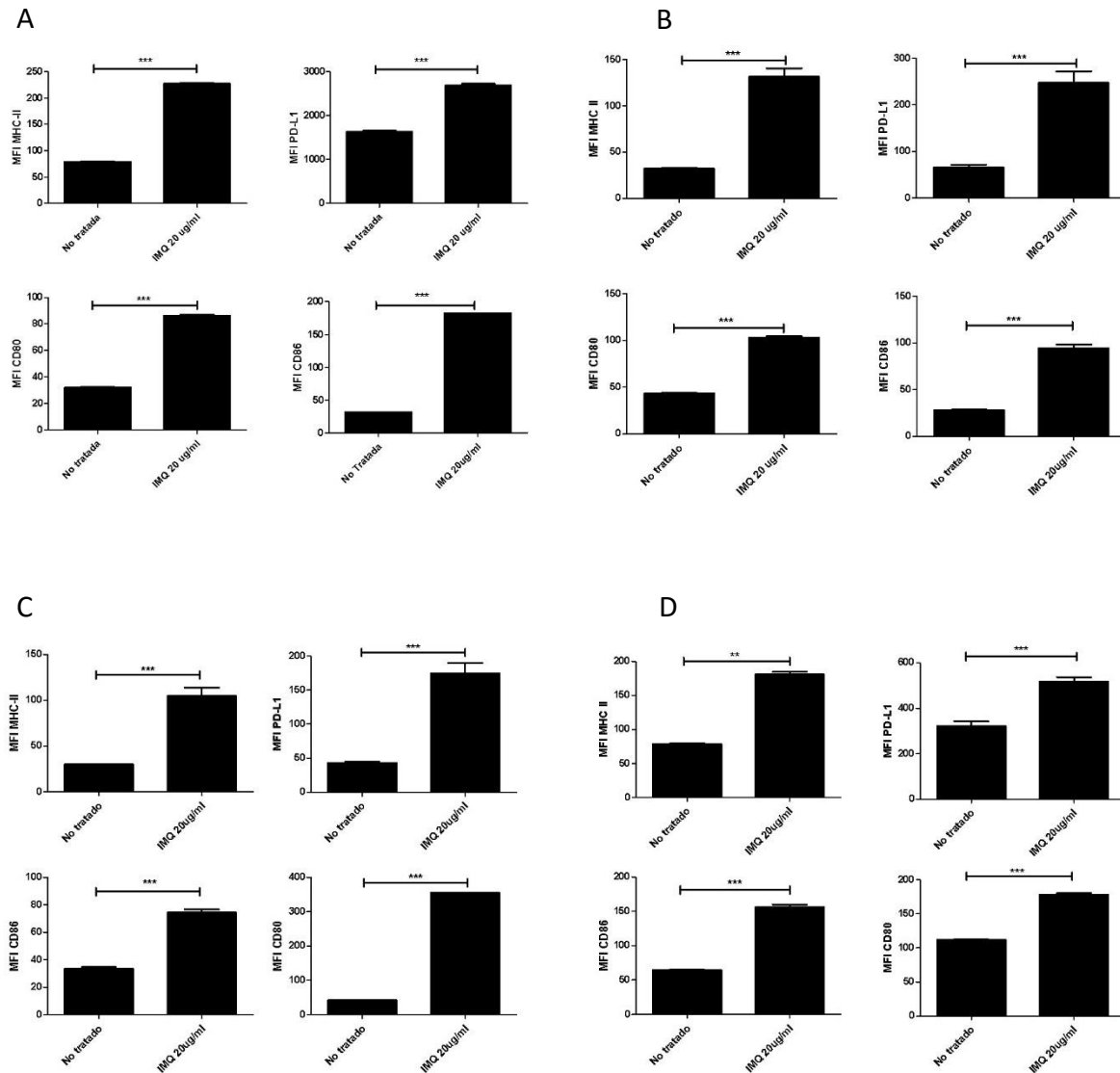
#### **5.4. Imiquimod aumenta la expresión de moléculas tanto co-estimuladoras como del complejo principal de histocompatibilidad de clase II en líneas de melanoma.**

Las líneas celulares derivadas de melanoma DFB, FMS, MEL3 y MEM L3 fueron tratadas, como se describió en Materiales y Métodos, por 48 hrs. Al analizar la expresión de las moléculas CD80, CD86, MHC II y PD-L1 en la línea celular DFB, observamos un aumento significativo en la intensidad media de para todas las moléculas analizadas en comparación con su control no tratado. Los niveles de PD-L1 están elevados antes y al finalizar el tratamiento (Figura 9 A).

El tratamiento con Imiquimod en la línea FMS (Figura 9 B), induce un aumento significativo en la expresión de todas las moléculas estudiadas. Observamos un aumento de la expresión de casi cuatro veces en MHC- II y CD86 en comparación con sus respectivos controles.

Al analizar la línea de melanoma MEL 3 (Figura 9 C), vimos un aumento significativo en la media de fluorescencia de todas las moléculas analizadas al compararlas con su respectivo control. Cabe mencionar el gran aumento de la expresión de la molécula co-estimuladora CD80 como consecuencia del tratamiento con Imiquimod.

Finalmente, observamos un comportamiento similar a los anteriores en la línea MEM L3 (Figura 9 D) al ser tratada por 48 hrs con 20µg/mL de Imiquimod, con un aumento significativo en la expresión tanto del complejo principal de histocompatibilidad clase II como en las co-estimuladoras e inhibitorias. Particularmente en esta línea se ve un incremento en la intensidad media de fluorescencia hasta 2 veces más que la condición no tratada en los marcadores analizados.



**Figura 9. Imiquimod induce expresión de moléculas co-estimuladoras y del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II en las líneas de melanoma humano.** La líneas de melanoma DFB (A), FMS (B), MEL 3 (C) y MEM L3 (D) fueron tratadas con 20µg/mL durante 48 hrs a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. La intensidad media de fluorescencia de las moléculas de superficie MHC-II, PD-L1, CD80, CD86 fue obtenida mediante citometría de flujo. Los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  SD de tres experimentos diferentes. El análisis estadístico fue realizado usando T-test. (\*\*\*) $p < 0,001$ . N= 3

### **5.5. Imiquimod aumenta la citotoxicidad mediada por células NK y linfocitos CD8<sup>+</sup> Mart-1 específicos, en líneas celulares de melanoma.**

Las líneas que fueron tratadas con Imiquimod mostraron un aumento significativo en la expresión de la molécula de presentación antigénica MHC I y un aumento en la molécula MICA/B, la cual está estrechamente relacionada al estrés celular, entre otras. Con estos datos, evaluamos si estos estímulos son necesarios para obtener un aumento en la citotoxicidad mediada por células NK y linfocitos CD8<sup>+</sup>, las subpoblaciones principales involucradas en la respuesta inmune antitumoral.

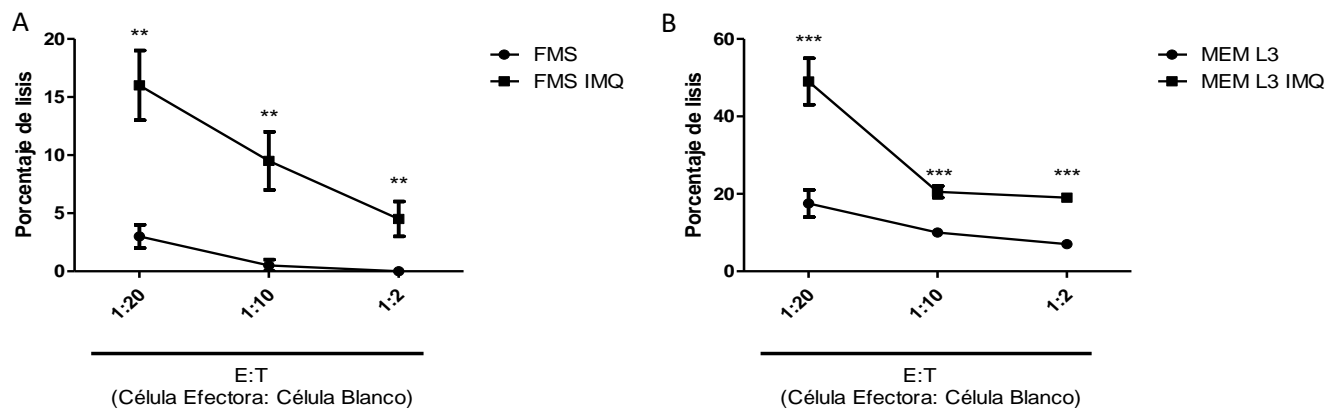
Realizamos un ensayo de citotoxicidad mediada por células NK a través de la detección en sobrenadante de Cr<sup>51</sup>, que se libera frente a la lisis de la célula diana. Enfrentamos las líneas FMS y MEM L3 a células NK según lo descrito en Materiales y Métodos. Seleccionamos estas líneas debido a que FMS es una de las líneas que al ser tratada con Imiquimod logra una inducción significativa de MIC A/B cercana del 50%. La elección de MEM-L3 fue fundada en que bajo condiciones basales esta línea posee altos niveles del complejo principal de histocompatibilidad de clase I y del ligando de NKG2D analizado. Luego del tratamiento los niveles de MHC-I aumentan cerca de un 10% y MIC A/B incrementa su expresión en un 30% aproximadamente. En este experimento pudimos observar un incremento en la citotoxicidad mediada por células NK en ambas líneas celulares cuando son tratadas con Imiquimod independiente de la razón E:T (célula efectora: célula blanco) utilizada (Figura 10).

Particularmente, MEM L3 tratada con Imiquimod (Figura 10 B) muestra un incremento en la citotoxicidad mediada por NK de un 18% en el control, hasta un 50% para la razón E:T más elevada.

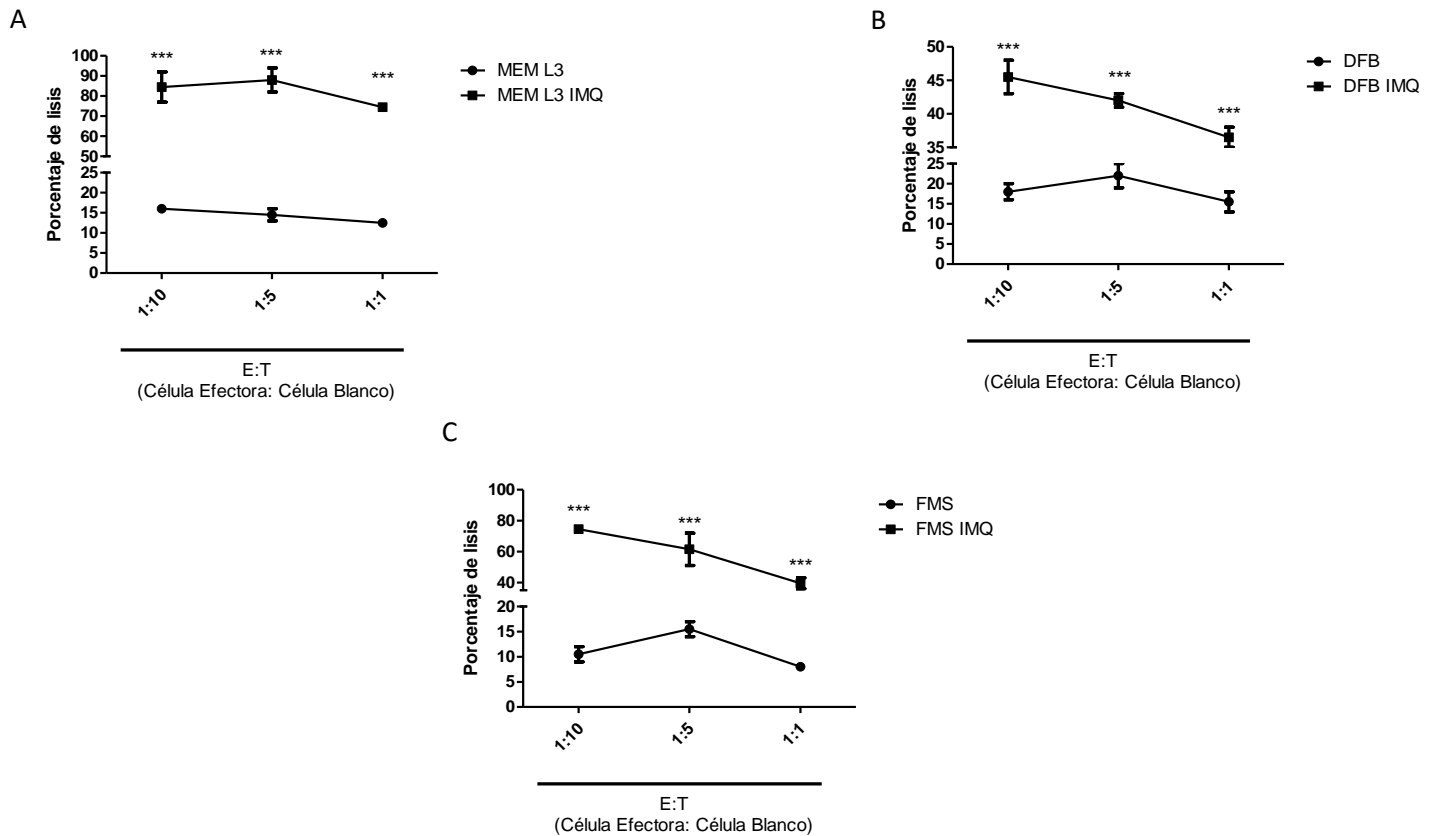
Para evaluar la citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup>, utilizamos un clon que reconoce el antígeno asociado a tumor Mart-1 en asociación a HLA-A2<sup>+</sup> Para



esto seleccionamos las líneas MEM L3, DFB y finalmente FMS (Figura 11), debido a que expresan el antígeno Mart-1 y la molécula de histocompatibilidad clase I humana HLA-A2<sup>+</sup>. El co-cultivo entre los linfocitos T CD8 y las distintas líneas de melanoma fue realizado en 3 razones E:T distintas (1:10; 1:5 y 1:1) por 4 hrs según lo señalado en Materiales y Métodos. La citotoxicidad por parte de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> sobre la línea celular MEM L3 (Figura 13 A), aumentó 4 veces con respecto a la condición no tratada, independiente de la razón ocupada. Como se muestra en la figura 11 B, la línea DFB también aumentó su lisis debido a la acción de la célula efectora, en comparación con la misma línea no tratada. En la última línea que se analizó (Figura 11 C), FMS, podemos ver que el agonista de TLR-7 es capaz de aumentar significativamente la citotoxicidad mediada por linfocitos CD8<sup>+</sup> específicos contra Mart-1, ya que permitió un aumento en el porcentaje de lisis casi 8 veces mayor que el control.



**Figura 10. Imiquimod aumenta la citotoxicidad medida por células NK, en líneas celulares de melanoma.** Líneas FMS (A) y MEM L3 (B) fueron tratadas por 48 hrs con 20 $\mu$ g/ml de Imiquimod. Luego fueron cargadas con Cr<sup>51</sup> para finalmente ser co-cultivadas a diferentes razones con células NK. El cromo liberado fue medido en el sobrenadante al finalizar 2 hrs de co-cultivo con el equipo *Top Count NK*. El análisis estadístico fue realizado usando *T-test* no pareado. (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). N= 3.



**Figura 11. Imiquimod aumenta la citotoxicidad mediada por linfocitos CD8<sup>+</sup> Mart-1 específicos, en líneas celulares de melanoma.** Líneas MEM L3 (A), DFB (B) y FMS (C) fueron tratadas por 48 hrs con 20µg/ml de Imiquimod. Luego fueron cargadas con Cr<sup>51</sup> para finalmente ser co-cultivadas con linfocitos CD8<sup>+</sup> Mart-1 específicos. El cromo liberado fue medido en el sobrenadante al finalizar 2 hrs de co-cultivo con el equipo *Top Count NK*. El análisis estadístico fue realizado usando *T-test* no pareado. (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). N= 3

## 6. Discusión.

El melanoma maligno es uno de los cánceres humano más agresivo y resistente al tratamiento. Es el causante del 75% de todas las muertes por cáncer de piel a nivel mundial (Siegel, *et al*, 2014). Es por esta razón que es necesario establecer estrategias de prevención y tratamientos. Las inmunoterapias de DCs han demostrado la capacidad de inducir respuestas inmunes en los pacientes tratados, sin embargo, estas respuestas no se correlacionan en la mayoría de los casos, con efectos clínicos persistentes. Esta situación es probablemente debida a múltiples factores, entre los cuales podemos nombrar escape de antígenos inmunodominantes, ausencia de señales de peligro adecuadas durante la inmunización, o deficiencias en la presentación de antígenos por parte de las DCs inyectadas. La entrega óptima de múltiples antígenos, junto con la presencia de factores que promueven la maduración adecuada de las células dendríticas son fundamentales para el éxito de estas vacuna.

En este contexto se inició en nuestro laboratorio, un protocolo clínico para pacientes con melanoma avanzado los cuales fueron inmunizados con células dendríticas autólogas cargadas con un lisado tumoral alogénico de tres líneas de melanoma (TRIMEL). Con más de 200 pacientes tratados a la fecha hemos demostrado que tenemos dos tipos de respuestas clínicas e inmunológicas en los pacientes tratados: un grupo que responde inmunológicamente a las inmunizaciones y que presenta una sobrevida tres veces superior a la mediana de sobrevida histórica y otro que no responde inmunológicamente cuya mediana de sobrevida es similar a la observada en los pacientes no tratados. Más aún, estos dos grupos de pacientes tienen perfiles de LT distintos, donde los pacientes respondedores tienen aumento de las poblaciones de linfocitos T efectores como  $T_H1$  y  $T_H17$ , mientras que los pacientes no respondedores tienen un aumento de las poblaciones de linfocitos T regulatorios como  $T_H3$ ,  $Tr1$  y  $Foxp3^+$ . La existencia de estos dos grupos de pacientes, nos lleva a buscar formas de modificar la terapia con el fin de aumentar su eficacia clínica y disminuir el porcentaje de pacientes no respondedores.

Se ha reconocido ya hace un par de décadas que la inmunidad innata es capaz de tener efecto sobre la inmunidad adaptativa (Medzhitov y Janeway, 1997). El descubrimiento de los receptores tipo Toll y su vía de señalización especialmente en DCs nos han llevado a desarrollar nuevos adyuvantes para estas. Un ejemplo de esto es la toxina de Coley's, un lisado bacteriano que posee propiedades inmunológicas, que logró incluso aminorar la progresión de algunos tipos de cánceres (Nauts *et al.*, 1953). En la actualidad se sabe que uno de los principales componentes de este adyuvante es ADN bacteriano, el cual señala a través de TLR-9. Es por esta razón que un adyuvante que señalice por un TLR intracelular como el TLR-7 o TLR-9 es buena opción, ya que, al activar estas vías se generarán respuestas del tipo  $T_H1$  produciendo de esta forma altos niveles de  $IFN-\gamma$ , la cuál es una citoquina clave en la inmunidad antitumoral ya que es capaz de interaccionar tanto con células NK como con linfocitos T  $CD8^+$  (Pahl y Cerwenka, 2005)

Napolitani y colaboradores en el 2007 demostraron que linfocitos  $CD4^+$ , co-cultivados con DCs las cuales fueron maduras con LPS y a la vez con un agonista TLR 7 se diferenciaban a un perfil mayoritariamente  $T_H1$ , en comparación con los linfocitos que fueron co-cultivados con DCs estimuladas con sólo una de las dos señales, generando de esta forma un efecto sinérgico entre un agonista TLR 4 y TLR 7.

TRIMEL, es capaz de otorgar antígenos tumorales y señales de peligro que logran activar y madurar las DCs. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que nuestro lisado es capaz de generar la translocación de calreticulina y HMGB1, los que actúan como señales de peligro, mediando una óptima maduración de las DCs y que esto puede estar favoreciendo la presentación cruzada de antígenos (Aguilera *et al.*, 2011). Como HMGB1 es capaz de señalar a través de la vía de TLR4 al entregar un estímulo como Imiquimod, el cual señala vía TLR 7, se podría estar generando un efecto sinérgico en las DCs.

En esta tesis observamos al dar estos dos estímulos, TRIMEL e Imiquimod, a una célula dendrítica derivada de monocito genera un aumento en la expresión de CD86 en membrana, en comparación cuando la célula dendrítica recibe solo TRIMEL. La molécula co-estimuladora CD86, también conocida como B7.2, es una

molécula clave en el proceso de co-estimulación entre célula dendrítica y linfocito T. También vimos que las células dendríticas maduras con este protocolo poseen una menor cantidad de CD40 en membrana en comparación con las que son estimuladas solo con TRIMEL. CD40 es un receptor proteico que está presente en las células dendríticas y su ligando es CD154 (CD40L) el cual está presente en varios subtipos celulares y también en linfocitos CD4<sup>+</sup>. Solo los linfocitos activados expresan CD40L, al unirse con su receptor genera un fuerte estímulo co-estimulador que entre otras cosas permite la producción y liberación de IL-12 (Van Kooten y Banchereu J, 2000). Este es un resultado contrastante ya que vemos por un lado un aumento de CD86 lo que indicaría que la DCs han madurado y son capaces de estimular a los linfocitos, pero la activación linfocitaria y concomitante expansión clonal, requiere de varios pasos, dentro de estos las señales co-estimuladoras son importantes, entre ellas CD40. Al haber menores niveles de CD40 en las TAPCells tratadas con Imiquimod uno esperaría que la activación linfocitaria y la diferenciación hacia un perfil T<sub>H</sub>1 por estas células fueran menor que con las TAPCells convencionales ya que estas últimas poseen mayores niveles de esta molécula co estimuladora. Sin embargo, esto no se manifestó en los co-cultivos realizados. Para entender con mayor claridad que otras señales podrían estar entregando las TAPCells tratadas con Imiquimod que compensen este efecto, se podría efectuar co-cultivos con fibroblastos transfectados con CD40L que permitan la secreción de citoquinas por parte de las TAPCells tratadas con Imiquimod de modo de estudiar tanto las citoquinas inflamatorias como regulatorias secretadas que puedan tener una implicancia en los linfocitos. El resultado del tratamiento de las TAPCells con Imiquimod sugiere que TRIMEL podría no estar señalizando vía TLR-7, ya que, se evidenció sutilmente una respuesta de maduración mayor en las DCs tratadas con TRIMEL e Imiquimod en comparación con las que solo llevaban TRIMEL. Para corroborar esta hipótesis de forma es necesario trabajar con DCs murinas que sean *tlr7*<sup>-/-</sup>, o bien generando *Knockdowns* en las células dendríticas humanas ocupando ARN interferentes para finalmente ver el rol de TLR-7 en las TAPCells y TAPCells tratada con Imiquimod.

La razón PD-L1/CD86 es importante en el balance de una respuesta inmunológica, así lo han evidenciado trabajos publicados de nuestro laboratorio (Falcón *et al*, aceptado para publicación). Mientras más pequeña sea esta relación hay mayor posibilidad de que la célula dendrítica sea capaz de entregar un conjunto de señales que permitan activar y al linfocito hacia una respuesta inmune que por ejemplo sea capaz de combatir un tumor, evitando así la anergia linfocitaria.

En esta tesis, demostramos que las DCs que fueron maduras con TRIMEL y a la vez recibieron Imiquimod, son capaces de inducir una población mayor de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ , que las que sólo se maduraron con TRIMEL en co-cultivos alogénicos de 3 días. Es así, que al finalizar el co-cultivo la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productora de IFN- $\gamma$  incrementó un 5% en estas condiciones experimentales. Pese a que hay estudios que demuestran que se puede alcanzar una diferenciación linfocitaria en 3 días cuando se co-cultivan linfocitos T con diversos tipos de DCs (Chaudhri *et al.*, 2009), creemos que el incremento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  puede mejorar si aumentamos el tiempo de co-cultivo a 5 días. En la misma línea, estas DCs fueron capaces de inducir un aumento en los linfocitos IFN- $\gamma$  e IL-17 dobles positivos. Las implicancias de esta población en la inmunología antitumoral no están del todo entendidas como si lo es en el campo de la neuroinmunobiología, en donde estos linfocitos son altamente inflamatorios e incluso incrementan la severidad de las enfermedades neurodegenerativas, ya que la liberación de estas citoquinas logran provocar una fuerte respuesta inmune inflamatoria (Lee *et al.*, 2012). Por otro lado, esta población doble positiva pueden ser linfocitos del perfil T<sub>H</sub>17 que están transformándose a linfocitos T<sub>H</sub>1 a través del proceso recientemente descrito como plasticidad linfocitaria. Particularmente la población T<sub>H</sub>17 es muy inestable y es capaz de sufrir plasticidad dependiendo de las citoquinas que haya en el microambiente donde se encuentran (Lee, *et al.*, 2009). Se ha descrito plasticidad de linfocitos T<sub>H</sub> 17 hacia el perfil T<sub>H</sub>1 tanto *in vitro*, como *in vivo*. Esto es debido a que estas células secretoras de IL-17 se encuentran en ambientes ricos de IL-12, la cual es una citoquina clave en la diferenciación de linfocitos vírgenes hacia linfocitos T<sub>H</sub>1 ya que permite la

activación del factor de transcripción maestro del linaje T-bet (Guéry y Hugues, 2015).

En este punto, nuestros resultados podrían indicar células dendríticas tratadas con TRIMEL e Imiquimod generan una mayor activación de éstas y por consiguiente una mayor activación y diferenciación a linfocitos del perfil T<sub>H</sub>1, en comparación con las células dendríticas tradicionalmente desarrolladas por nuestro laboratorio.

*Aldara*® es el nombre del fármaco tópico cuyo compuesto activo es el agonista de TLR-7, Imiquimod. Originalmente *Aldara*® fue aprobado por la FDA para su uso en lesiones genitales causadas por el virus de papiloma y en cáncer basocelular. Actualmente se ha estado estudiando su alcance en otro tipo de cáncer de piel como lo es el melanoma maligno (Aspord *et al.*, 2014). En este último caso la información es bastante limitada con respecto a cómo ejerce su acción, salvo que, como se mencionó ya en esta tesis, parte de su acción es en parte debido a la inducción apoptosis.

En el presente trabajo quisimos ver el efecto de Imiquimod en líneas celulares de melanoma y de esta forma describir, en parte, la forma en que Imiquimod podría estar ejerciendo su acción para tratar melanoma maligno.

Al evaluar marcadores relacionados con la presentación antigénica y estrés celular vimos que para todas las líneas celulares analizadas que Imiquimod aumenta la expresión, de las moléculas de histocompatibilidad, moléculas co-estimuladoras como lo es CD86 y el ligando de NKG2D, MICA/B, al ser estimulados con Imiquimod. Estos efectos no son por inducción de apoptosis, como se demostró en la figura 8. También observamos un incremento de PD-L1, en las líneas analizadas. El estudio de PD-L1 en células tumorales ha sido ampliamente estudiado y se sabe que esta molécula es sobre expresada en células cancerosas ya que este elemento es clave en la evasión del sistema inmune por parte del tumor (Mahoney *et al.*, 2015; Luu *et al.*, 2014). Al observar un alto nivel de CD86, MICA/B, MHC I, MHC II y PD-L1 en membrana de las células de melanoma después del tratamiento con Imiquimod, nos llamó la atención que los niveles de PD-L1 son



mucho más elevados en comparación con las otras moléculas analizadas y puede que el efecto de los linfocitos CD8<sup>+</sup> se viese mermado. Sin embargo, al evaluar la citotoxicidad mediada por NK y linfocitos CD8<sup>+</sup> específicos contra Mart-1, sobre las líneas de melanoma observamos que la citotoxicidad era considerablemente mayor cuando las líneas son tratadas con Imiquimod. En la literatura no hay reportes de esta modulación de la inmunogenicidad de las líneas de melanoma por parte de Imiquimod, lo que ha sido reportado es el tratamiento de esplenocitos murinos con agonistas TLR-7 como lo son Imiquimod y Gardiquimod (Ma *et al.*, 2010) en donde se evidencia una mayor lisis contra la línea de melanoma murina B16. Este resultado nos lleva a pensar que el aumento en la citotoxicidad mediada por células NK, se debe al aumento de la expresión de MICA/B cuando la línea es tratada con Imiquimod, aunque otros ligandos de NKG2D no han sido estudiados. Esta inducción es más fuerte que las señales de inhibición, como lo sería el aumento de MHC I, el cual es concomitante con el aumento de MICA/B. Para corroborar esta hipótesis a futuro realizaremos ensayos de citotoxicidad bloqueando las moléculas MICA y MICB para evaluar su real rol en esta interacción célula efectora con célula blanco. El aumento de la citotoxicidad mediada por linfocitos CD8<sup>+</sup>, se podría atribuir entre otras cosas a la alta expresión del complejo de histocompatibilidad de clase I en membrana después de que las líneas celulares de melanoma se tratasen con Imiquimod, por lo cual, el linfocito CD8<sup>+</sup> podría reconocer de forma más fácil las células tumorales ya que hay mayor posibilidades de que el tumor esté expresando el antígeno Mart-1 en contexto MHC I.

Esta tesis, da los primeros pasos en nuevas estrategias que permitan mejorar la terapia TAPCells al ocupar un adyuvante que active TLR-7 ya que esta estrategia favorecería una mayor diferenciación hacia perfiles linfocitarios antitumorales. Además en este manuscrito observamos la modulación de la inmunogenicidad de líneas tumorales debido a Imiquimod, lo que estaría explicando en parte, una de las formas en que Imiquimod logra reducción tumoral en modelos murinos cuando es administrado de forma tópica (Adams *et al.*, 2008).

## 7. Conclusiones y proyecciones

En base a este trabajo podemos concluir que la administración de Imiquimod como adyuvante de la terapia TAPCells permite que estas células dendríticas clínicamente efectivas eleven aún más sus marcadores de maduración como lo es CD86 y disminuyan señales de anergia linfocitaria como PD-L1. Este cambio favorecería una mayor activación y diferenciación linfocitaria hacia un perfil antitumoral como lo es el T<sub>H</sub>1. También, logramos demostrar una nueva forma en que Imiquimod podría actuar sobre tumores de melanoma cuando es dado de forma tópica, ya que, logra modular la inmunogenicidad de estas células logrando así, que el sistema inmune las detecte para finalmente generar una respuesta inmune antitumoral efectiva contra ellas.

Sin embargo, aún nos falta dilucidar el patrón de citoquinas producidas por las TAPCells tratadas con Imiquimod y evaluar el nivel de proliferación alcanzado por los linfocitos al entrar en contacto con las TAPCells tratadas con Imiquimod.

También, tenemos contemplado pasar de *in vitro* a *in vivo*, así en ratón evidenciaremos el impacto de las TAPCells tratadas con Imiquimod, en la regresión tumoral y sobrevida del individuo.

Finalmente, evaluar el rol de la sobreexpresión en membrana de MICA/B en la inmunogenicidad de las líneas de melanoma tratadas para ver si esta inducción es suficiente para aumentar la citotoxicidad por parte de las células NK.

## 8. Bibliografía.

Adams, S., O'Neill, D. W., Nonaka, D., Hardin, E., Chiriboga, L., Siu, K & Bhardwaj, N. (2008). Immunization of malignant melanoma patients with fulllength NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant. *The Journal of Immunology*, 181(1), 776-784.

Adema, G. J. (2009). Dendritic cells from bench to bedside and back. *Immunology letters*, 122(2), 128-130.

Aguilera, R., Saffie, C., Tittarelli, A., González, F. E., Ramírez, M., Reyes, D. & Salazar-Onfray, F. (2011). Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clinical Cancer Research*, 17(8), 2474-2483.

Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*, 2(8), 675-680.

Ardavin, C., Amigorena, S., & e Sousa, C. R. (2004). Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy. *Immunity*, 20(1), 17-23.

Aspord, C., Tramcourt, L., Leloup, C., Molens, J. P., Leccia, M. T., Charles, J., & Plumas, J. (2014). Imiquimod inhibits melanoma development by promoting pDC cytotoxic functions and impeding tumor vascularization. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(10), 2551-2561.

Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-252.

Beutner, K. R., Spruance, S. L., Hougham, A. J., Fox, T. L., Owens, M. L., & Douglas, J. M. (1998). Treatment of genital warts with an immune-response modifier (imiquimod). *Journal of the American Academy of Dermatology*, 38(2), 230-239.

Bikker, A., Kruize, A. A., van der Wurff-Jacobs, K. M., Peters, R. P., Kleinjan, M., Redegeld, F. & van Roon, J. A. (2014). Interleukin-7 and toll-like receptor 7 induce synergistic B cell and T cell activation. *PloS one*, 9(4), e94756.

Böhm, W., Thoma, S., Leithäuser, F., Möller, P., Schirmbeck, R., & Reimann, J. (1998). T cell-mediated, IFN- $\gamma$ -facilitated rejection of murine B16 melanomas. *The Journal of Immunology*, 161(2), 897-908.

Bonasio, R., & von Andrian, U. H. (2006). Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Current opinion in immunology*, 18(4), 503-511.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. C., & Steinman, R. M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8<sup>+</sup> T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine*, 196(12), 1627-1638.

Brahmer, J. R., Drake, C. G., Wollner, I., Powderly, J. D., Picus, J., Sharfman, W. H., & Topalian, S. L. (2010). Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *Journal of Clinical Oncology*, 28(19), 3167-3175.

Chaudhri, G., Quah, B. J., Wang, Y., Tan, A. H., Zhou, J., Karupiah, G., & Parish, C. R. (2009). T cell receptor sharing by cytotoxic T lymphocytes facilitates efficient virus control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(35), 14984-14989.

Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancerimmunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1-10.

Chiang, C. L. L., Coukos, G., & Kandalaft, L. E. (2015). Whole Tumor Antigen Vaccines: Where Are We?. *Vaccines*, 3(2), 344-372.

Cohen, R. B. (2014). Current challenges and clinical investigations of epidermal growth factor receptor (EGFR)-and ErbB family-targeted agents in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Cancer treatment reviews*, 40(4), 567-577.

Delamarre, L., Holcombe, H., & Mellman, I. (2003). Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *The Journal of experimental medicine*, 198(1), 111-122.

Deng, J., Zhang, Y., Feng, J., & Wu, F. (2010). Dendritic cells loaded with ultrasound-ablated tumour induce in vivo specific antitumour immune responses. *Ultrasound in medicine & biology*, 36(3), 441-448.

Dominguez-Villar, M., Gautron, A. S., de Marcken, M., Keller, M. J., & Hafler, D. A. (2015). TLR7 induces anergy in human CD4+ T cells. *Nature immunology*, 16(1), 118-128.

Durán, C., Segal, G., Salazar, L., Pereda, C., Falcón, C., Tempio, F., & LÓPEZ, M. (2012). The immunological and Clinical Outcomes of DC-Vaccinated Melanoma Patients Are Associated with Increased Th1/Th17 and Reduced Th3 Cytokine Responses. *Cancer Immunol Immunother*, 62, 761-72.

Escobar, A., Lopez, M., Serrano, A., Ramirez, M., Perez, C., Aguirre, A & Salazar - Onfray, F. (2005). Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin\_2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clinical & Experimental Immunology*, 142(3), 555-568.

Cristián Falcón-Beas, Gabriela Mora, Fabián Tempio, Claudio Pérez, Carolina Behrens, Felipe Falcón-Beas, Pola Garrido, Cristián Pereda, Andrés Tittarelli, Flavio Salazar-Onfray, and Mercedes N. López. (2015). Dexamethasone Turns Tumor Antigen-Presenting Cells Induced by a Melanoma Lysate into Tolerogenic Dendritic Cells with Tumor Specific T Cell Inhibitory Functions. *Journal of immunology*, (enviado)

Farolfi, A., Ridolfi, L., Guidoboni, M., Nicoletti, S. V. L., Piciucchi, S., Valmorri, L., & Ridolfi, R. (2012). Ipilimumab in advanced melanoma: reports of long-lasting responses. *Melanoma research*, 22(3), 263-270.

Fehres, C. M., Bruijns, S., Beelen, A. J., Kalay, H., Ambrosini, M., Hooijberg, E., & Kooyk, Y. (2014). Topical rather than intradermal application of the TLR7 ligand imiquimod leads to human dermal dendritic cell maturation and CD8+ T-cell cross - priming. *European journal of immunology*, 44(8), 2415-2424.

Gibson, S. J., Lindh, J. M., Riter, T. R., Gleason, R. M., Rogers, L. M., Fuller, A. E., & Vasilakos, J. P. (2002). Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cellular immunology*, 218(1), 74-86.

Gong, L., Wang, Y., Zhou, L., Bai, X., Wu, S., Zhu, F., & Zhu, Y. F. (2014). Activation of toll-like receptor-7 exacerbates lupus nephritis by modulating regulatory T Cells. *American journal of nephrology*, 40(4), 325-344.

González, F. E., Gleisner, A., Falcón-Beas, F., Osorio, F., López, M. N., & Salazar-Onfray, F. (2014). Tumor cell lysates as immunogenic sources for cancer vaccine design. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(11), 32613269.

Goldinger, S. M., Dummer, R., Baumgaertner, P., Mihic-Probst, D., Schwarz, K., Hammann-Haenni, A. & Michielin, O. (2012). Nano \_particle vaccination combined with TLR\_7 and \_9 ligands triggers memory and effector CD8+ T \_cell responses in melanoma patients. *European journal of immunology*, 42(11), 3049-3061.

Gnjatic, S., Nishikawa, H., Jungbluth, A. A., Güre, A. O., Ritter, G., Jäger, E., & Old, L. J. (2006). NY \_ESO\_1: Review of an Immunogenic Tumor Antigen. *Advances in cancer research*, 95, 1-30.

Gilboa, E. (2007). DC-based cancer vaccines. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1195.

Grichnik, J. M. (2007). Melanoma, nevogenesis, and stem cell biology. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(10), 2365-2380.

Guillerey, C., Chow, M. T., Miles, K., Olver, S., Sceneay, J., Takeda, K., & Smyth, M. J. (2015). Toll-Like Receptor 3 regulates NK cell responses to cytokines and controls experimental metastasis. *OncolImmunology*, (just-accepted), 00-00.

Guéry, L., & Hugues, S. (2015). Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed research international*, 2015.

Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M. & Nussenzweig, M. C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 194(6), 769-780.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., & Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88–dependent signaling pathway. *Nature immunology*, 3(2), 196-200.

Hewson, C. A., Jardine, A., Edwards, M. R., Laza-Stanca, V., & Johnston, S. L. (2005). Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells. *Journal of virology*, 79(19), 12273-12279.

Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., & Fukuhara, S. (2002). Interferon- $\alpha$  and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *The Journal of experimental medicine*, 195(11), 1507-1512.

Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, 16(4), 343-353.

Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20(1), 197-216.



Jin, B., Sun, T., Yu, X. H., Yang, Y. X., & Yeo, A. E. (2012). The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.

Katz S.I., Tamaki K., Sachs D.H. (1979). Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature*, 282: 324–326.

Kim, H. S., Kang, D., Moon, M. H., & Kim, H. J. (2014). Identification of Pancreatic Cancer-Associated Tumor Antigen from HSP-Enriched Tumor Lysate-Pulsed Human Dendritic Cells. *Yonsei medical journal*, 55(4), 1014-1027.

Kirkwood, J. M., Butterfield, L. H., Tarhini, A. A., Zarour, H., Kalinski, P., & Ferrone, S. (2012). Immunotherapy of cancer in 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(5), 309-335.

Kono, H., & Rock, K. L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*, 8(4), 279-289.

Klebanoff, C. A., Acquavella, N., Yu, Z., & Restifo, N. P. (2011). Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? *Immunological reviews*, 239(1), 27-44.

Knutson, K., & Disis, M. L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 54 (8), 721-728.

Krieg, A. M. (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nature reviews Drug discovery*, 5(6), 471-484.

Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F. J., Xiao, S., Peters, A., & Kuchroo, V. K. (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology*, 13(10), 991-999.

Lens, M. B., & Dawes, M. (2004). Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *British Journal of Dermatology*, 150(2), 179-185.

Liu, K., Iyoda, T., Saternus, M., Kimura, Y., Inaba, K., & Steinman, R. M. (2002). Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *The Journal of experimental medicine*, 196(8), 1091-1097.

Liu, Z., Noh, H. S., Chen, J., Kim, J. H., Falo, L. D., & You, Z. (2008). Potent tumor-specific protection ignited by adoptively transferred CD4<sup>+</sup> T cells. *The Journal of Immunology*, 181(6), 4363-4370.

Lopez, M., Escobar, A., Alfaro, J., Fodor, M., Larrondo, M., Ferrada, C., & Salazar-Onfray, F. (2004). [Advances in cellular immunotherapy for malignant melanoma]. *Revista medica de Chile*, 132(9), 1115-1126.

López, M. N., Pereda, C., Segal, G., Muñoz, L., Aguilera, R., González, F. E., & Salazar-Onfray, F. (2009). Prolonged survival of dendritic cell–vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor  $\beta$ -expressing T cells. *Journal of Clinical Oncology*, 27(6), 945-952.

Lu, J., Lee-Gabel, L., Nadeau, M. C., Ferencz, T. M., & Soefje, S. A. (2014). Clinical evaluation of compounds targeting PD-1/PD-L1 pathway for cancer immunotherapy. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 1078155214538087.

Ma, F., Zhang, J., Zhang, J., & Zhang, C. (2010). The TLR7 agonists imiquimod and gardiquimod improve DC-based immunotherapy for melanoma in mice. *Cellular & molecular immunology*, 7(5), 381-388.

Mahoney, K. M., Freeman, G. J., & McDermott, D. F. (2015). The next immunecheckpoint inhibitors: PD-1/PD-L1 blockade in melanoma. *Clinical therapeutics*, 37(4), 764-782.

Matzner, P., Sorski, L., Shaashua, L., Elbaz, E., Lavon, H., Melamed, R., & Ben-Eliyahu, S. (2015). Perioperative treatment with the new synthetic TLR4 agonist GLA<sub>SE</sub> reduces cancer metastasis without adverse effects. *International Journal of Cancer*.

Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1996). On the semantics of immune recognition. *Research in immunology*, 147(4), 208-214.

Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology*, 9(1), 4-9.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-397.

Medzhitov, R., & Janeway, C. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological reviews*, 173(1), 89-97.

Mellman, I., & Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106(3), 255-258.

Metcalfe, W., Anderson, J., Trinh, V., & Hwu, W. J. (2015). Anti-Programmed Cell Death-1 (PD-1) Monoclonal Antibodies in Treating Advanced Melanoma. *Discovery medicine*, 19(106), 393-401.

Müller, T., Hamm, S., & Bauer, S. (2008). TLR9-mediated recognition of DNA. In *Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity* (pp. 51-70). Springer Berlin Heidelberg.

Nauts, H. C., Fowler, G. A., & BOGATKO, F. H. (1953). A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study. *Acta medica Scandinavica. Supplementum*, 276, 1.

Oble, D. A., Loewe, R., Yu, P., & Mihm, M. C. (2009). Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immunity Archive*, 9(1), 3.

Ostrand-Rosenberg, S., Horn, L. A., & Haile, S. T. (2014). The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *The Journal of Immunology*, 193(8), 3835-3841.

Ouyang, W., Kolls, J. K., & Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 28(4), 454-467.

Pahl, J., & Cerwenka, A. (2015). Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity. *Immunobiology*.

Palucka, A. K., Ueno, H., Connolly, J., Kerneis-Norvell, F., Blanck, J. P., Johnston, D. A. & Banchereau, J. (2006). Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *Journal of Immunotherapy*, 29(5), 545-557.

Palucka, K., & Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 265-277.

Paul, W. E., & Seder, R. A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, 76(2), 241-251.

Radej, S., Roliński, J., Rawicz-Pruszyński, K., Bury, P., Borowski, G., Furmaga, J & Maciejewski, R. (2015). Immunomodelling Characteristics of Mature Dendritic Cells Stimulated by Colon Cancer Cells Lysates. *Polish Journal of Surgery*, 87(2), 71-82.

Rigel, D. S. (2010). Trends in dermatology: melanoma incidence. *Archives of dermatology*, 146(3), 318-318.

Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., & Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(2), 588-593.

Sabado, R. L., Miller, E., Spadaccia, M., Vengco, I., Hasan, F., & Bhardwaj, N. (2013). Preparation of tumor antigen-loaded mature dendritic cells for immunotherapy. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (78), e50085-e50085.

Salcedo, M., Bercovici, N., Taylor, R., Vereecken, P., Massicard, S., Duriau, D., & Velu, T. (2006). Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with

an allogeneic tumor cell lysate. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55(7), 819-829.

Schadendorf, D., Ugurel, S., Schuler-Thurner, B., Nestle, F. O., Enk, A., Bröcker, E. B., & Schuler, G. (2006). DCs study group of the DeCOG. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed Dcs (Dcs) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: A randomized phase III trial of the DCs study group of the DeCOG. *Ann. Oncol*, 17, 563-570.

Simpson, A. J., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y. T., & Old, L. J. (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5(8), 615-625.

Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., & Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(1), 9-29.

SVANE, I., Soot, M. L., Buus, S., & Johnsen, H. E. (2003). Clinical application of dendritic cells in cancer vaccination therapy. *Apmis*, 111(7.8), 818-834.

Steinman, R. M. (2003). Some interfaces of dendritic cell biology. *Apmis*, 111 (7 .8), 675-697.

Steinman, R. M. (2008). Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity*, 29(3), 319-324.

Steinman, R. M. (2012). Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annual review of immunology*, 30, 1-22.

Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K. H., & Lavelle, E. C. (2006). A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine*, 203 (7), 1685-1691.

Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., & Akira, S. (1999). TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene*, 231(1), 59-65.

Thomas\_Kaskel, A. K., Waller, C. F., Schultze Seemann, W., & Veelken, H. (2007). Immunotherapy with dendritic cells for prostate cancer. *International journal of cancer*, 121(3), 467-473.

Tittarelli, A., González, F. E., Pereda, C., Mora, G., Muñoz, L., Saffie, C., & Salazar-Onfray, F. (2012). Toll-like receptor 4 gene polymorphism influences dendritic cell in vitro function and clinical outcomes in vaccinated melanoma patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(11), 2067-2077.

Tscharke, D. C., Croft, N. P., Doherty, P. C., & La Gruta, N. L. (2015). Sizing up the key determinants of the CD8+ T cell response. *Nature Reviews Immunology*.

Tsuji, T., Sabbatini, P., Jungbluth, A. A., Ritter, E., Pan, L., Ritter, G., & Gnjjatic, S. (2013). Effect of Montanide and poly-ICLC adjuvant on human self/tumor antigen-specific CD4+ T cells in Phase I overlapping long peptide vaccine trial. *Cancer immunology research*, 1(5), 340-350.

Van Kooten, C., & Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand. *Journal of leukocyte biology*, 67(1), 2-17.

Walzer, T., Dalod, M., Vivier, E., & Zitvogel, L. (2005). Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses.

Wille-Reece, U., Flynn, B. J., Loré, K., Koup, R. A., Kedl, R. M., Mattapallil, J. J & Seder, R. A. (2005). HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(42), 15190-15194.

Wille-Reece, U., Flynn, B. J., Loré, K., Koup, R. A., Miles, A. P., Saul, A., & Seder, R. A. (2006). Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. *The Journal of experimental medicine*, 203(5), 1249-1258.

Xu, M., Mizoguchi, I., Morishima, N., Chiba, Y., Mizuguchi, J., & Yoshimoto, T. (2010). Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clinical and Developmental immunology*, 2010.

You, J., Wang, C. L., & Hao, X. S. (2007). [Allogeneic dendritic cell vaccine pulsed with heat shocked tumor cell lysate can enhance antitumor immunity]. *Zhonghua yi xue za zhi*, 87(39), 2785-2790.